

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Medicina**



**MÉTODOS PARA LA INVESTIGACIÓN  
FARMACOLÓGICA ANIMAL *IN VIVO* EN EL APARATO  
URINARIO INFERIOR: INDAGANDO SOBRE LOS  
EFECTOS URODINÁMICOS DE CLOMIPRAMINA,  
IMIPRAMINA, DOXEPINA, AMITRIPTILINA,  
DULOXETINA, MILNACIPRAN, OXIBUTININA,  
BESIPIRDINA Y SU METABOLITO HP-748**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO C. PÉREZ MARTÍNEZ**

**MADRID, 2006**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Medicina**



**MÉTODOS PARA LA INVESTIGACIÓN  
FARMACOLÓGICA ANIMAL *IN VIVO* EN EL APARATO  
URINARIO INFERIOR: INDAGANDO SOBRE LOS  
EFECTOS URODINÁMICOS DE CLOMIPRAMINA,  
IMIPRAMINA, DOXEPINA, AMITRIPTILINA,  
DULOXETINA, MILNACIPRAN, OXIBUTININA,  
BESIPIRDINA Y SU METABOLITO HP-748**

**TESIS DOCTORAL  
FRANCISCO C. PÉREZ MARTÍNEZ**

**DIRECTOR: PROF. REMIGIO VELA NAVARRETE**

**MADRID, 2006**



**El Prof. Remigio Vela Navarrete, Catedrático de Urología de la  
Universidad Autónoma de Madrid**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo, presentado por D. Francisco C. Pérez Martínez, titulado **“Métodos para la investigación farmacológica animal *in vivo* en el aparato urinario inferior: indagando sobre los efectos urodinámicos de clomipramina, imipramina, doxepina, amitriptilina, duloxetina, milnacipran, oxibutinina, besipirdina y su metabolito HP-748”**, realizado bajo mi dirección, reúne los requisitos formales, científicos y metodológicos suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral y lograr la obtención del título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Madrid, a 6 de Marzo de 2007.

**Prof. Remigio Vela Navarrete**

Arzobispo Morcillo, 2  
28029 Madrid  
[www.uam.es](http://www.uam.es)

A Ana,  
a mis amigos,  
a mis hermanos, tíos y abuelos,  
a mis padres

## Agradecimientos

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento,

A mi director de tesis, el Prof. Vela Navarrete, por sus continuas muestras de apoyo y siempre acertados consejos, así como por estar siempre ahí en cuanto lo he necesitado.

A Carlos Castilla por la ayuda recibida desde el Departamento de Cirugía Experimental y Experimentación Animal, habiendo recibido la orientación imprescindible para desarrollar los modelos animales utilizados en todo este tiempo. ¡A SUS PIES!

A Ana, porque todo este tiempo pasó más deprisa a su lado. ¡TE QUIERO!

A mi querida Ana y a Alberto por los dibujos mostrados en esta tesis doctoral, por utilizar su arte en hacer esta tesis más bonita. ¡GENIOS!

A todos los que trabajan en el Animalario, mis queridas Pilar, Juani, Luisa, Carlos, Raúl y Toñi por tratarme como a un hijo y hacerme sentir tan querido en todo momento. ¡NUNCA OS OLVIDARÉ!

A Isabel Gallego por saberlo todo, y ofrecer su ayuda a todo el mundo, sin importarle sus propias necesidades. ¡ÁNIMO!

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz por permitirme, gracias a una beca de investigación, realizar esta tesis y cumplir con ello uno de mis mayores deseos. Además, gracias por haber permitido que realizara una estancia en Estados Unidos. ¡ACABARÉ LO QUE EMPEZAMOS JUNTOS!

A todo el Servicio de Urología por su amabilidad, y en especial al Dr. Calahorra por sus valiosas sugerencias y su inestimable ayuda. ¡BUEN FUTURO!

A la gente de la FJD - Esther, Miriam, María, Isabel, Mati, Carmina, etc... - por hacerme sentir bien y conseguir que desconectara en los momentos difíciles. ¡SUERTE CON LA INVESTIGACIÓN!

Al laboratorio de metabolismo mineral y óseo, y en especial a su jefe, Pedro Esbrit, por permitirme colaborar con ellos y publicar resultados francamente interesantes. ¡ESPERO QUE SIGAMOS COLABORANDO!

Al Servicio de Anatomía Patológica, en especial a Trini, José Luís y Félix, por no saber decir “NO” cuando les daba más trabajo. ¡SIENTO LAS MOLESTIAS!

A Valentín Calvo, por permitir que la biblioteca de la FJD sea tan cómoda para estudiar, y por conseguirme todos los artículos que he necesitado para realizar esta Tesis Doctoral. ¡SILENCIO!

Al Dr. Robert Levin por permitirme una estancia bajo su dirección en el “Albany College of Pharmacy” (U.S.A.). ¡CONGRATULATION!

A Yung y Wei, dos urólogos de Taiwán, que hicieron mi estancia en Estados Unidos mucho más confortable, y de los que siempre guardaré buenos recuerdos. ¡MY FRIENDS!

*Todo **proyecto particular**, sea cual sea, no tiene sentido sino como **parte de un proyecto más general**. Todas las adaptaciones funcionales de los seres vivos como también todos los artefactos configurados por ellos cumplen proyectos particulares que es posible considerar como aspectos o fragmentos de un proyecto primitivo único, que **es la conservación y la multiplicación de la especie**.*

*Jacques Monod*

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
1.1 FISIOPATOLOGÍA VESICAL .....	2
1.2 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN EL CONTROL DE LA DINÁMICA MICCIONAL.....	4
1.2.1 MODELO NEUROHUMORAL DE LA MICCIÓN .....	4
1.2.2 NUEVOS CONOCIMIENTOS DE LA DINÁMICA MICCIONAL.....	5
1.2.3 INCONTINENCIA URINARIA DE ESFUERZO.....	7
1.2.4 HIPERACTIVIDAD VESICAL.....	9
1.3 ESFINTER URINARIO EXTERNO.....	10
1.3.1 CONTROL NERVIOSO DEL ESFÍNTER URINARIO EXTERNO .....	13
1.4 INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DINÁMICA CONTINENCIA/MICCIÓN. MODELOS ANIMALES.....	18
1.5 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DE LA INCONTINENCIA URINARIA.....	22
1.5.1 ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS.....	23
1.5.2 INHIBIDORES DUALES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA Y NOREPINEFRINA .....	26
1.5.3 ANTIMUSCARÍNICOS .....	27
1.5.4 NUEVOS TRATAMIENTOS PARA LA INCONTINENCIA DE ESFUERZO .....	28
<b>II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 JUSTIFICACIÓN .....	31
2.2 HIPÓTESIS .....	32
2.3 OBJETIVOS .....	32



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS ..... 34**

3.1 ANIMALES .....	35
3.2 COMPUESTOS Y SOLUCIONES .....	35
3.3 CATETERIZACIÓN VESICAL EN CONEJOS MACHOS .....	41
3.4 CISTOSTOMÍA SUBCUTÁNEA EN HEMBRAS.....	41
3.5 ESTUDIO CISTOMÉTRICO .....	44
3.6 PARÁMETROS CISTOMÉTRICOS .....	49
3.7 ESTUDIO ELECTROMIOGRÁFICO .....	50
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	51

### **IV. RESULTADOS ..... 52**

4.1 RESULTADOS .....	53
4.2 ESTUDIO DE CLOMIPRAMINA.....	53
4.3 ESTUDIO DE IMIPRAMINA .....	55
4.4 ESTUDIO DE DOXEPINA.....	56
4.5 ESTUDIO DE AMITRIPTILINA.....	58
4.6 ESTUDIO DE DULOXETINA .....	59
4.7 ESTUDIO DE MILNACIPRAN.....	60
4.8 ESTUDIO DE OXIBUTININA .....	62
4.9 ESTUDIO DE BESIPIRDINA.....	63
4.10 ESTUDIO DEL METBOLITO HP-748 DE BESIPIRDINA .....	65

<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
5.1 IMPORTANCIA DEL NÚCLEO DE ONUF EN EL CONTROL NERVIOSO DEL TRACTO URINARIO.....	68
5.2 FARMACOLOGÍA DE LA INCONTINENCIA DE ESFUERZO .....	71
5.3 ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS .....	73
5.4 INHIBIDORES DUALES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA Y NOREPINEFRINA .....	86
5.5 ANTIMUSCARÍNICOS .....	94
5.6 BESIPIRDINA: UNA NUEVA ALTERNATIVA FARMACOLÓGICA PARA PROMOVER EL ALMACENAMIENTO DE ORINA .....	96
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>103</b>

## **ABREVIATURAS**

IU.....	Incontinencia Urinaria
ICS.....	International Continence Society
EUE.....	Esfínter Urinario Externo
EUI.....	Esfínter Urinario Interno
SNC.....	Sistema Nervioso Central
Ach.....	Acetilcolina
5-HT.....	Serotonina
NE.....	Norepinefrina
Actividad EMG-EUE..	Actividad Electromiográfica del EUE
AT(s).....	Antidepresivo(s) Tricíclico(s)
CV.....	Capacidad Vesical
EAE.....	Esfínter Anal Externo
TUI.....	Tracto Urinario Inferior
NANC.....	No Adrenérgica – No Colinérgica
SNRI(s).....	Inhibidor(es) Dual(es) de la Recaptación de 5-HT y NE
IV.....	Intravenosa / Intravenosamente
IM.....	Intramuscular / Intramuscularmente
CMG.....	Cistometrograma
VM.....	Volumen Miccional
CV.....	Capacidad Vesical
PV.....	Presión Vesical
AM.....	Amplitud de la contracción Miccional
DM.....	Duración de la contracción Miccional
IEM.....	Intervalo Entre contracciones Micciones
Actividad EMG-EAE..	Actividad Electromiográfica del EAE

## **I. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 FISIOPATOLOGÍA VESICAL**

La vejiga se podría definir como un globo rodeado de una capa mucosa en el interior, una capa muscular (detrusor) como parte principal y una túnica adventicia en el exterior. La cúpula vesical está situada intraperitonealmente, mientras que su base es extraperitoneal, de tal forma que se permite su distensión, adoptando una forma esférica cuando está llena, y a medida que se vacía, la vejiga va adoptando una forma piriforme.

La unidad estructural del músculo detrusor es el fascículo, definido como un grupo de 4-12 células musculares lisas interrelacionadas (1). El detrusor en su conjunto es un agregado de fascículos, interconectados entre sí, con distintas orientaciones que forman una estructura muscular rodeada por gruesos tabiques de intersticio. Estos haces musculares forman una red tridimensional a través de todo el cuerpo vesical, excepto en cuello y trigono vesical, cuyos haces musculares siguen el mismo patrón que el músculo uretral. La compleja estructura del detrusor permite que se puedan realizar las funciones de llenado y vaciamiento (2); siendo por esta multifuncionalidad, bastante vulnerable.

La orina se produce de manera continua en los riñones y se envía a la vejiga, donde se almacena hasta que supera un umbral de capacidad, momento en el que la orina es expulsada rápidamente al exterior a través de la micción, que consiste en la contracción conjunta de las fibras longitudinales, circulares y oblicuas del detrusor. La presión en la vejiga debe ser baja durante la fase de llenado, para permitir que llegue la orina desde los riñones y ser acomodable hasta adquirir un cierto volumen. Para forzar la salida de orina a través de la uretra en la fase de micción, se debe producir un incremento de presión vesical al mismo tiempo que una disminución de la resistencia uretral, y esta situación debe mantenerse durante el tiempo suficiente para permitir el vaciamiento completo de la vejiga.

Esta función dual continencia/micción de la vejiga es muy importante y su alteración puede provocar consecuencias graves para el individuo. Las implicaciones clínicas que conllevan los disturbios en la **fase de continencia**, que pueden ser producidas por una disfunción uretral o una hiperactividad vesical, son síntomas tales como aumento de la frecuencia miccional, urgencia, incontinencia de apremio y nocturia, mientras que las alteraciones en la **fase miccional** producen dificultad para iniciar la micción, chorro débil, sensación de vaciamiento incompleto de la vejiga y micción por rebosamiento, y pueden deberse a una obstrucción urinaria o al deterioro de la función del detrusor (1).

En la actualidad, la incontinencia urinaria (IU) afecta a más de 2 millones de personas en España y a cerca de 50 millones en todo el mundo. La IU femenina, como es definida por la International Continence Society (ICS), es la pérdida involuntaria de orina por la uretra (3). Este es un problema social y frecuente en la mujer, que puede ser clínicamente dividido en 1) **IU de esfuerzo**, pérdidas de orina debidas a determinados esfuerzos tales como la risa, el estornudo, el deporte, la carga de objetos pesados o el mero hecho de ponerse en pie o agacharse. Afecta a más de 1 millón de mujeres, siendo el tipo más común de IU en mujeres (50%) (4,5); 2) **IU de urgencia**, pérdidas involuntarias de orina asociadas a una necesidad imperiosa y repentina de orinar; e 3) **IU mixta**, la pérdida de orina se produce por una hiperactividad del detrusor y un trastorno en los mecanismos esfinterianos, es decir, es la combinación de los dos tipos de IU anteriores (6).

## **1.2 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN EL CONTROL DE LA DINÁMICA MICCIONAL**

### **1.2.1 MODELO NEUROHUMORAL DE LA MICCIÓN**

La descripción fisiológica de la **dinámica miccional** ha estado basada en los progresos acontecidos en la investigación básica, desarrollándose el modelo “**neurohumoral de la micción**” (7,8). Según este modelo, todos los elementos musculares que participan en la dinámica miccional tienen una doble inervación autónoma, simpática y parasimpático (9), incluido el esfínter urinario externo (EUE) o rabdoesfínter, que estaría inervado por ramas motoras del nervio pudendo. Durante la fase de llenado estaría activada la vía simpática, motivando la contracción tónica del esfínter urinario interno (EUI) y del EUE, donde dominan los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, mientras que durante la fase miccional estaría activada la vía parasimpática, contrayéndose el detrusor gracias al estímulo colinérgico (10). La integración de esta actividad podría producirse a varios niveles según las circunstancias, 1) a nivel del **plexo ganglionar perimural**, un plexo de neuronas de axones cortos que establecen conexiones a nivel perivesical, entre los sistemas nerviosos simpático y parasimpático; 2) a nivel espinal, en los **núcleos simpático y parasimpático**; y finalmente, 3) la integración más fina, se produciría a nivel del tallo cerebral en la llamada Región “M” o Centro pontino de la micción o **núcleo de Barrington**.

Como puede verse en este modelo “neurohumoral de la micción”, **neurotransmisores y receptores periféricos** eran considerados los protagonistas de este proceso dinámico (8,10). Por otro lado, el arco aferente tenía poca representatividad y el EUE era ignorado en condiciones fisiológicas (11).

### 1.2.2 NUEVOS CONOCIMIENTOS DE LA DINÁMICA MICCIONAL

Las nuevas aportaciones a la dinámica miccional realzan la existencia de **actividades** detrusorianas **no neurogénicas** (12), el papel del **sistema nervioso central (SNC)** en el control de la dinámica miccional (13,14), y otorgan un mayor protagonismo al **EUE** (15). Dentro de la actual fisiología miccional, vemos que el detrusor puede contraerse mediante dos mecanismos distintos, el **neurogénico** y el **miogénico** (16,17). En el neurogénico, estímulos variados producen la descarga de acetilcolina (Ach) que, actuando sobre los receptores colinérgicos a nivel vesical, motiva la contracción del detrusor. Por otro lado, en el mecanismo miogénico, la distensión del detrusor motiva cambios de polarización en la célula muscular con entrada masiva de calcio y la consiguiente contracción vesical, sin participación obligada de neurotransmisores. Este nuevo concepto tiene extraordinaria importancia porque otorga al **arco aferente** un papel especial, que puede explicar circunstancias patológicas que tradicionalmente eran difíciles de comprender con el modelo “neurohumoral de la micción” y no respondían a tratamientos teóricamente útiles (10,16,17).

El papel del SNC (18,19), sobre todo a nivel del área preóptica del hipotálamo y de los núcleos del sistema reticular y suprapontino, ha sido realzado en la actualidad gracias a las modernas técnicas que permiten reconocer las áreas activadas en el cerebro durante la micción y su potencial influjo, como activadores o inhibidores de la función vesical (20). La información generada por **mecanorreceptores** ante la distensión de la pared vesical entraría a la médula por los nervios pélvicos siguiendo el tracto espino-cerebral alcanzando el tallo cerebral (21). Desde allí, desde el **núcleo de Barrington** se enviarían los correspondientes estímulos a los centros medulares simpáticos y parasimpáticos, incluyendo el **núcleo de Onuf** (22). Pero la coordinación del proceso miccional no sucede en la parte inferior medular, en la zona de los núcleos medulares, sino que se produce en el área del puente cerebral, en el Núcleo de Barrington (2,10,23). Este centro no sólo coordina la actividad vegetativa, sino también la motora



especialmente referida al esfínter estriado. Hay otro centro, aparentemente independiente, denominado “**Región L**”, donde se coordina la continencia (2,10,23). Se tienen ahora evidencias de que los neurotransmisores utilizados para estas actividades de control, constituyen dos vías de acción distintas pero complementarias. Por un lado, estarían las **neuronas glutaminérgicas** que tienen como misión activar las motoneuronas parasimpáticas sacras, son excitatorias y controlan la actividad del detrusor; y por otro, estarían las **neuronas gabaminérgicas** que tendrían función inhibitoria sobre el núcleo de Onuf y su misión sería relajar el esfínter estriado durante la micción (24,25).

El EUE tradicionalmente se ha considerado controlado en su actividad tónica mediante el “**bucle gamma**” (8,26). Este modelo de inervación justificaba la utilización de los inhibidores polisinápticos como dantrolene y baclofene (27). Una interacción continuada de señales excitatorias e inhibitorias producidas por terminaciones somáticas presentes en la musculatura estriada, en los llamados “husos musculares”, alcanzarían la médula por sus raíces posteriores estableciendo contactos con las motoneuronas del asta anterior y con el núcleo del pudendo, desde donde se producirían los estímulos correspondientes para el control de la tonicidad y de la contracción muscular del EUE (26). La visión actual concede un protagonismo especial al **núcleo de Onuf**, un grupo de motoneuronas altamente sensibles a la actuación de la **serotonina (5-HT)** y la **norepinefrina (NE)**. El incremento de estos neurotransmisores en dicha zona motivaría la contracción del EUE (12,21,24,28,29).

### 1.2.3 INCONTINENCIA URINARIA DE ESFUERZO

La IU de esfuerzo femenina, definida como la pérdida involuntaria de orina durante el incremento de la presión abdominal en ausencia de contracciones vesicales, es una patología frecuente que tiene un significativo impacto sobre la calidad de vida (30,31). Esta patología generalmente ocurre como resultado de defectos en varios mecanismos reflejos que mantienen la uretra cerrada en presencia de una presión abdominal elevada.

En varios estudios se ha demostrado que los reflejos uretrales mediados por la innervación de los nervios pudendo e hipogástrico forman parte de los mecanismos de cierre uretral durante la distensión vesical en la fase de almacenamiento (13), y que dichos mecanismos son cruciales para prevenir la pérdida de orina cuando hay un incremento repentino de la presión abdominal durante, por ejemplo, el estornudo (32). En concreto, en el control nervioso de los reflejos vesicouretrales durante el incremento de la presión vesical, destaca 1) la innervación aferente a través del nervio pélvico, el cual está conectado con receptores de tensión y volumen a nivel vesical, 2) la innervación eferente del reflejo por medio de vías simpáticas del nervio hipogástrico, innervando el músculo liso uretral, y 3) la innervación de vías somáticas del nervio pudendo, innervando músculos estriados a nivel uretral y del suelo pélvico (33,34).

En pacientes con **IU de esfuerzo**, se han visto una serie de alteraciones entre las que destacan: 1) un incremento del número de fibras musculares en el suelo pélvico que muestran una alteración patológica (35), 2) una disminución de las fibras musculares tipo II (de contracción rápida) en el suelo pélvico (36), 3) una denervación parcial de la musculatura del suelo pélvico debida a la alteración de la innervación por parte del nervio pudendo (37,38), 4) una disminución de la actividad electromiográfica del EUE (EMG-EUE) (39), y 5) unas fibras musculares estriadas más finas que las normales (40).

Los tratamientos de la IU de esfuerzo son variados, y su efectividad depende de la gravedad del proceso. La **cirugía** se considera el tratamiento de elección en la IU genuina de estrés femenina, lográndose así la fijación de la musculatura pélvica y la recuperación del mecanismo fisiológico de continencia. Por otro lado, hasta el momento se han estado utilizando diversos **grupos farmacológicos** ( $\alpha$ -adrenérgicos, antidepresivos tricíclicos (ATs), estrógenos, etc...) (41) como alternativa a la cirugía, sin que los resultados globales de estos fármacos alcanzaran los objetivos pretendidos. Otros tratamientos para la IU de esfuerzo femenina son la **estimulación eléctrica**, utilizada para aumentar la resistencia de la musculatura estriada pélvica y recuperar la función de soporte de estas estructuras (42,43), la **inyección de sustancias expansoras de volumen** por vía transuretral o transvaginal, bajo control endoscópico, tales como el colágeno, politetrafluoroetileno, silicona, semillas de carbón, dextranómero, ácido hialurónico, e incluso tejidos autólogos como grasa (44,45), y el **esfínter urinario artificial** (46,47).

Actualmente, la posibilidad de un tratamiento médico ha evolucionado. Así, **duloxetina** ha mostrado ser un compuesto eficaz y seguro en el tratamiento de la IU de esfuerzo (48-51), y es el primer fármaco aprobado en la Unión Europea para el tratamiento específico de esta patología. Duloxetina tiene un predominante efecto a nivel central a través de las motoneuronas del nervio pudendo que se localizan en el núcleo de Onuf, para estimular el EUE (52-54). Este efecto a nivel central es más importante que el efecto periférico estimulando el músculo liso uretral, el cual es, presumiblemente, el modo de actuar de varios agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, compuestos en ocasiones utilizados para tratar la IU de esfuerzo femenina, aunque no esté aprobado su uso para el tratamiento específico de esta patología.

Las características mecánicas y metabólicas de duloxetina sugieren que su patrón de seguridad debe ser común al de otras moléculas de la misma clase, y en consecuencia, también podrían ser útiles para el

tratamiento de la IU de esfuerzo, sin mostrar marcados efectos secundarios que limiten su empleo.

#### 1.2.4 HIPERACTIVIDAD VESICAL

La **hiperactividad vesical** es un síntoma complejo definido por la ICS como urgencia de la micción, con o sin IU de urgencia, pero normalmente asociada con aumento de la frecuencia miccional y con nocturia (55). La hiperactividad vesical la sufre alrededor del 17% de la población, y su incidencia aumenta con la edad (56-58).

Aunque la mayoría de los casos de hiperactividad vesical se atribuyen a una causa idiopática, también puede ser resultado de una sensibilización de las terminaciones nerviosas aferentes a nivel vesical o uretral, de cambios en el detrusor debidos a su denervación, o de alteraciones en las vías inhibitorias del SNC (59).

Los **tratamientos** disponibles para la hiperactividad vesical incluyen clases para **cambiar el comportamiento**, **ejercicios** del suelo pélvico y **cirugía**, aunque el tratamiento **farmacológico**, especialmente con antimuscarínicos, es el más frecuente para tratar la hiperactividad vesical (60-63). Las neuronas colinérgicas son abundantes en el SNC y juegan un papel importante en la memoria y la actividad cerebral (64), por lo que el deterioro de estas funciones que se produce con tratamientos anticolinérgicos hace que su prescripción en la actualidad sea limitada, especialmente en el anciano (65).

El modo de actuar de los antimuscarínicos, tradicionalmente considerado producto de su actuación sobre receptores muscarínicos a nivel del detrusor, ha llegado a ser un tema controvertido. A dosis terapéuticas, los antimuscarínicos no inhiben la fase de vaciamiento del ciclo miccional, mientras que sí que actúan sobre la fase de llenado vesical, mejorando la urgencia, la frecuencia, la nocturia, la IU e incrementando la capacidad

vesical (CV). Estos datos han llevado a sugerir una hipótesis reciente que sugiere que los fármacos antimuscarínicos pueden actuar a través de otros mecanismos relacionados con vías de innervación aferente, opuestas a otras vías nerviosas eferentes (66).

Son numerosas las hipótesis que intentan explicar el mecanismo por el que se producen ciertos casos de IU y la implicación de estructuras del SNC que necesitan ser estudiadas más en profundidad. Por ejemplo, estructuras del tallo cerebral y del diencefalo, como los ganglios basales, la zona gris periacueductal y el área preóptica del hipotálamo, se cree que forman parte de las vías reflejas de la micción (2,20). Además, las enfermedades que afectan a estas vías, como el Parkinson, producen una disminución del umbral para enviar impulsos que controlan el reflejo miccional, a través del tracto reticuloespinal, siendo alta la incidencia de hiperactividad vesical en estos enfermos de Parkinson (67).

### **1.3 ESFINTER URINARIO EXTERNO**

El EUI es una estructura anatómica muy importante para mantener la continencia urinaria en individuos sanos. Así, estas personas con la vejiga llena de contraste y en posición de pie, muestran que la continencia se produce a nivel del cuello vesical (26). Es precisamente la tonicidad del músculo liso de la uretra proximal y del cuello vesical, y su innervación adrenérgica como motor de la misma, el protagonista fundamental de la continencia en condiciones fisiológicas.

La estructura del EUE está formada por haces de músculo estriado en disposición circular y por una fascia que lo rodea. Estos haces musculares que componen el EUE se orientan en dirección vertical y ventrolateral, con fijaciones a la fascia subpúbica y a la fascia medial del músculo elevador del ano. Además, las fibras de músculo estriado se han identificado en un tercio de la uretra humana, presentando una apariencia de letra griega "omega".

Hay estudios recientes que muestran que el EUE adopta esta forma de letra “omega” desde que nacemos, en contra de estudios previos que sugerían que el EUE tenía una configuración casi en forma de anillo al nacer, y que llegaba a ser semejante a la letra “omega” durante el primer año de vida (26).

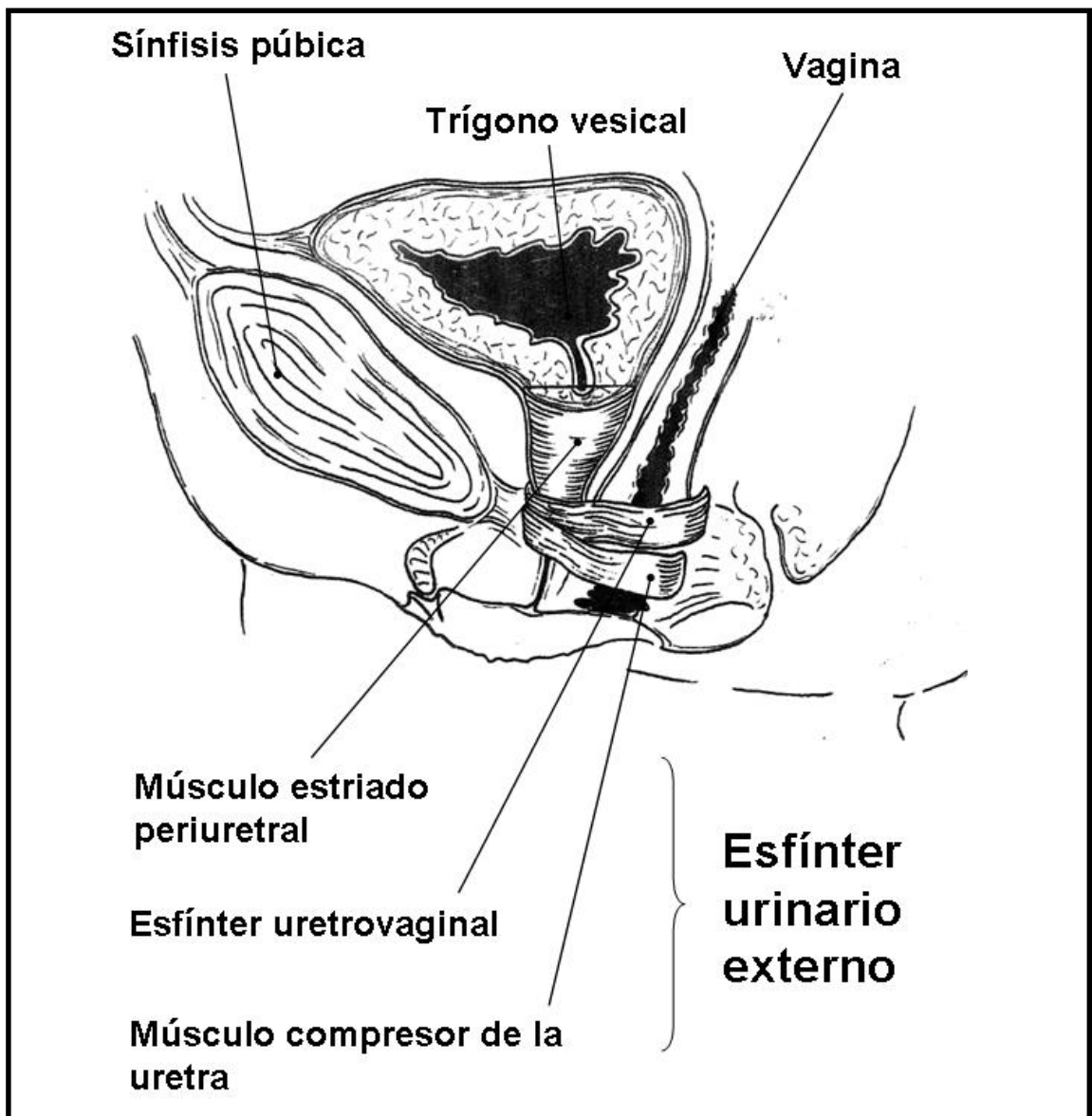


Figura 1. Esfínter Urinario Externo femenino y músculos complementarios.

En la mujer (Fig. 1), la capa más externa de la uretra está compuesta por fibras de músculo estriado. En la porción más proximal, las fibras musculares se disponen circularmente, constituyendo la porción funcional más importante, el auténtico rabdoesfínter, el que motiva la resistencia uretral a nivel de la uretra media. La porción más distal, comparte fibras musculares con la pared vaginal (esfínter uretrovaginal), y presenta un significativo refuerzo periuretral (músculo compresor de la uretra) (26).

La función fisiológica del EUE ha sido infravalorada hasta hace relativamente poco tiempo (68,69). En los esquemas tradicionales de la dinámica continencia/micción, la función del EUE quedaba reducida a su capacidad de parar bruscamente la micción cuando fuese necesario. También se le asignaba un papel relevante en el llamado reflejo de protección de la continencia (**guarding reflex**), activado cuando se produce un aumento brusco de la presión intraabdominal (15,26).

Éstas eran las misiones fundamentales del EUE en condiciones fisiológicas. Por el contrario, en circunstancias patológicas, el EUE recuperaba un protagonismo singular de enorme trascendencia. La espasticidad del periné y de los miembros inferiores que afecta a muchos parapléjicos, incrementa la tonicidad del EUE de tal manera que genera hipertonía y disinergia, no relajándose durante la micción, causa de la grave uropatía obstructiva que sufren estos pacientes. También, en mujeres jóvenes con ovarios poliquísticos se implica a la hipertonidad del EUE en la retención urinaria padecida por estas mujeres (70). La hipertonidad del EUE y la consecuente obstrucción funcional se continúa con un daño severo de los tractos urinarios inferior y superior, que a veces puede estar acompañada de infección y que continúa siendo una patología difícil de tratar farmacológicamente, incluso utilizando inhibidores polisinápticos o bloqueantes  $\alpha$ -adrenérgicos (26).

En la actualidad, se piensa que el EUE desempeña un papel más importante en el mantenimiento de la continencia urinaria, por lo que el

descubrimiento de nuevos neurotransmisores integrados en la actividad fisiológica del esfínter estriado es un tema de reciente actualidad.

### 1.3.1 CONTROL NERVIOSO DEL ESFÍNTER URINARIO EXTERNO

El EUE es apenas un componente en una mezcla de musculatura estriada compleja que compone el suelo pélvico, y recibe innervación principalmente de axones que se originan en las motoneuronas de la médula espinal sacra y alcanzan su objetivo a través del nervio pudendo (71,72). Esta innervación motora proviene de motoneuronas localizadas en el núcleo de Onuf, el cual se describió en 1899 por Onufrowicz como grupo X, y está situado en el asta ventral de la médula espinal, extendiéndose desde la S1 hasta la S3 (73-78). En el ser humano, las motoneuronas que innervan el EUE se localizan en la parte ventrolateral del núcleo de Onuf, estando este núcleo en el asta ventral a nivel S1-S2 de la médula espinal. Por otro lado, el núcleo de Onuf es ocupado, en su parte dorsomedial, por motoneuronas que innervan el esfínter anal externo (EAE). Además, motoneuronas procedentes del núcleo de Onuf también innervan el músculo isquiocavernoso y el bulboesponjoso (79). Esta misma localización de las motoneuronas que innervan el EUE y el EAE, existe en el conejo, en el gato, en el hámster, en la cobaya, en el perro y en el mono (74,75,80-84). En la rata, sin embargo, las motoneuronas del EAE y del EUE están localizadas a nivel L5-L6 de la médula espinal en dos núcleos separados, el dorsolateral y el dorsomedial, respectivamente (85,86).

Otro aspecto de interés está relacionado con la innervación del nervio pudendo. Juenemann KP y cols (87) observaron que el EUE y el EAE estaban innervados por fibras nerviosas somáticas derivadas de las raíces sacras S2 y S3 (núcleo de Onuf) que componen el nervio pudendo, pero algunas fibras que salen de estos segmentos medulares se separan y van a innervar el músculo elevador del ano y el esfínter intrínseco de la uretra. Estas características neuroanatómicas del EUE y del EAE fueron ratificadas por otras investigaciones histomorfológicas (88). En contraposición, Walsh PC y



Donker PJ (89) previamente habían postulado que la innervación somática del EUE se producía a través de los nervios cavernosos, y en consecuencia, a través de haces neurovasculares.

Además de la innervación del EUE a través de ramas terminales del nervio pudendo y de fibras nerviosas extrapudendas que salen de las raíces sacras S2-S3, otros estudios han identificado fibras sensoriales que proceden del nervio dorsal del pene y que entran en el EUE (90,91). De hecho, se cree que estas últimas ramas representan una parte de la innervación sensorial aferente, la cual desempeña un papel importante en el reflejo miccional.

Es muy conocido que el temor, la ansiedad, la temperatura ambiental y los estímulos auditivos, tal como una corriente de agua, pueden afectar al deseo de orinar. Bajo condiciones de irritación y obstrucción vesical, el vaciamiento de la vejiga puede llegar a ser cada vez más complicado, a la vez que la inflamación produce urgencia, aumento de la frecuencia y reduce la capacidad de llenado de la vejiga. De hecho, estas enfermedades obstructivas e irritativas, producen una resistencia prolongada al desagüe, provocando una hipertrofia de la pared vesical con la consiguiente anormalidad urodinámica que se produce en estos pacientes.

Investigaciones recientes han podido demostrar muy variadas singularidades en los elementos musculares del EUE y del EAE, así como en el núcleo medular del pudendo (92). La mayor parte de las células musculares estriadas del cuerpo humano están controladas por grandes motoneuronas  $\alpha$ -adrenérgicas, que contactan con las fibras musculares extrafusales, y por pequeñas neuronas motoras gamma, que contactan con las fibras musculares intrafusales (26). Sin embargo, las motoneuronas del esfínter estriado son uniformes en su tamaño, más pequeñas que las  $\alpha$ -motoneuronas, pero más grandes que las motoneuronas gamma (26,93). Su tamaño homogéneo probablemente refleja el hecho de que en estos esfínteres estriados, uretral y anal, no hay fibras musculares intrafusales.

El glutamato es un neurotransmisor importante en las vías eferentes supraespinales y en la rama aferente del reflejo de la micción (94). Hay estudios donde se ha demostrado que la actividad neuronal del esfínter estriado puede ser estimulada farmacológicamente para promover el almacenamiento de orina (28,95,96), y esto es posible principalmente por la participación del glutamato. Mientras el nervio pudendo recibe señales glutaminérgicas excitatorias, continúan las contracciones del EUE, y el tracto urinario inferior (TUI) permanece en la fase de almacenamiento. Por el contrario, la supresión de la transmisión glutaminérgica sirve como señal para que se relaje el EUE y se vacíe la vejiga (94,97). Simultáneamente y de manera sinérgica y coordinada, los núcleos pontinos actuarían sobre los núcleos simpático (D10-L2) y parasimpático (S2-S4), completándose el esquema tradicional de la dinámica neurohumoral de la continencia y la micción (Figs. 2 y 3).

De este modo, aunque se ha postulado que el glutamato es el neurotransmisor clave para inhibir la micción, es decir, para la continencia urinaria, su acción a nivel espinal se encuentra modulada por otros neurotransmisores como la NE y la 5-HT, que aumentan los efectos inhibidores de la micción del glutamato (10,52).

La 5-HT se sintetiza a partir del triptófano en varias etapas en las que participan distintas enzimas, y se ha demostrado que tiene efectos sobre la dinámica miccional (98,99). La 5-HT puede actuar directamente, actuando sobre el detrusor, o indirectamente, actuando sobre el SNC, aunque predominan claramente los efectos centrales sobre los periféricos (100). En la vejiga humana, la 5-HT tiene 2 efectos opuestos sobre la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica: 1) a **concentraciones bajas** potencia la contracción vesical por actuar sobre receptores atípicos presinápticos que incrementan la producción de Ach; y 2) a **concentraciones altas** tiene un efecto relajante a nivel vesical por la interacción con receptores 5-HT tipo 1 (101,102).

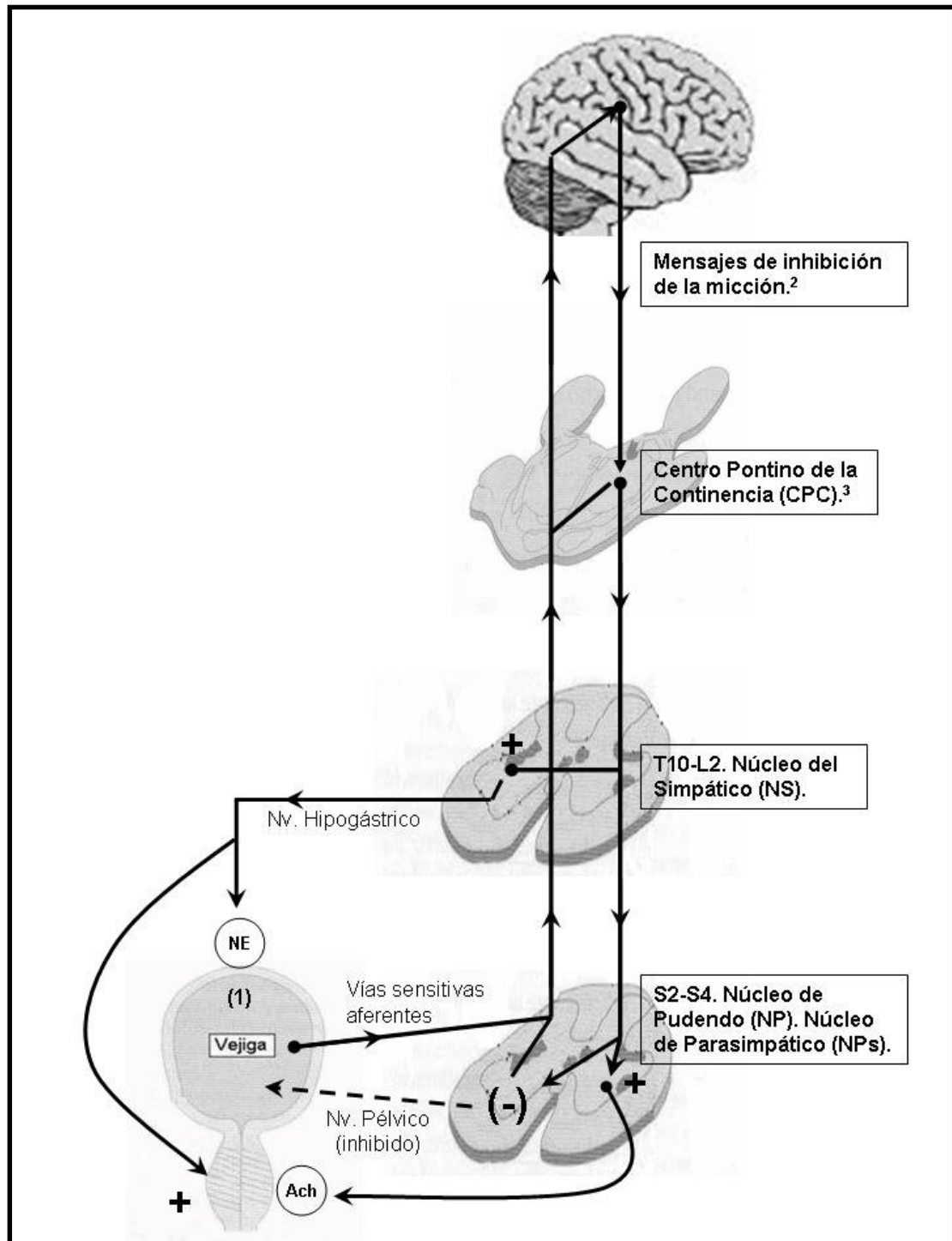


Figura 2. CONTROL NEURAL DE LA CONTINENCIA. <sup>1</sup>El progresivo llenado vesical activa receptores de distensión y señales sensitivas de intensidad creciente transmitidas al SNC. <sup>2</sup>Control cerebral con mensajes inhibitorios. <sup>3</sup>El centro pontino de la continencia recibe los mensajes inhibitorios y activa el NS (liberando NE para el estímulo del área esfinteriana y la relajación del detrusor), el NP con incremento del tono del rabdoesfínter. Por otro lado, inhibe simultáneamente el NPs.

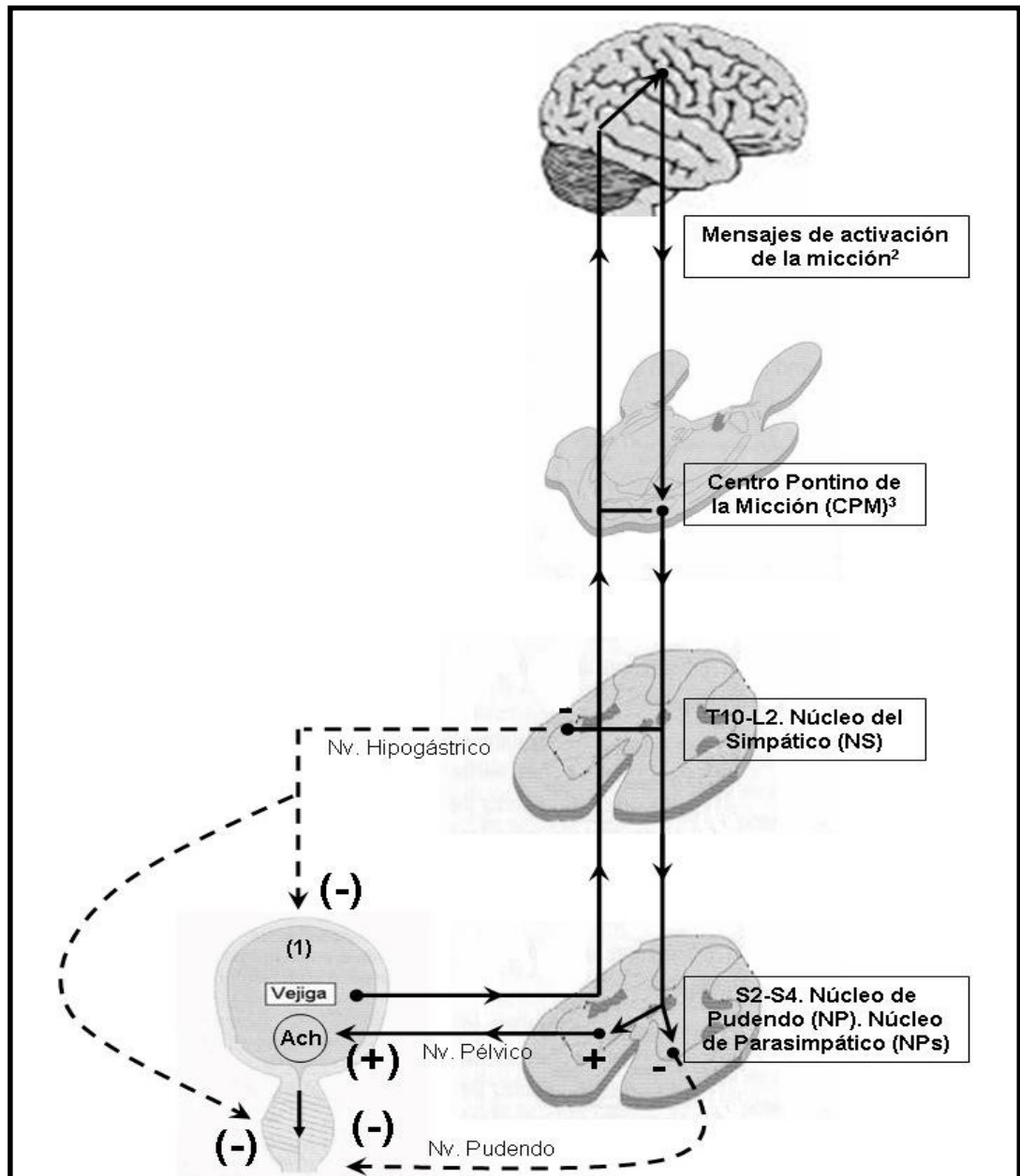


Figura 3. CONTROL NEURAL DE LA MICCIÓN. <sup>1</sup>Receptores de distensión y señales sensitivas advierten del deseo miccional al cerebro. <sup>2</sup>La orden cerebral consciente es transmitida al CPM<sup>3</sup> que coordina simultáneamente el estímulo del NPs y la inhibición del NS y del NP.

## **1.4 INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DINÁMICA CONTINENCIA/MICCÓN. MODELOS ANIMALES**

La investigación animal es un paso esencial para el conocimiento de la fisiología del TUI, tanto en condiciones normales como patológicas (14,103). Los estudios isométricos en baños de órganos, permiten estudiar de forma conjunta o independiente, el comportamiento del detrusor y de la uretra, dándonos una información muy valiosa acerca de su fisiología, pudiendo estudiar su comportamiento ante distintos estímulos farmacológicos (8,104). De hecho, con estos estudios, se puede dibujar el mapa de receptores presentes a nivel del TUI y diseñar estrategias de actuación para controlar la disfunción detrusoesfinteriana. Sin embargo, estos estudios *in vitro* no evalúan la integración con otras estructuras, como en el caso de estudios *in vivo*.

Cuando se diseñan modelos animales para el estudio del efecto farmacológico de diferentes compuestos en el TUI, es importante tener en cuenta que no todos los animales son del mismo tamaño y que la distribución de los receptores neurohumorales a este nivel también varía en cada especie.

La respuesta del detrusor ante estímulos farmacológicos ha sido investigada midiendo los cambios de presión intravesical a través de un catéter vesical colocado por **cateterización transuretral** (Fig. 4) (105,106) o mediante **cistostomía** (Figs. 5 y 6A) (53,97,107-125). Los modelos animales han sido tanto isovolumétricos, llenando la vejiga con el volumen exacto de líquido, como de **infusión continua**, llenando la vejiga a una velocidad constante utilizando una bomba de infusión y dejando que se vacíe tras cada contracción miccional, consiguiendo un número relativamente elevado de ciclos continencia/micción en poco tiempo (104).

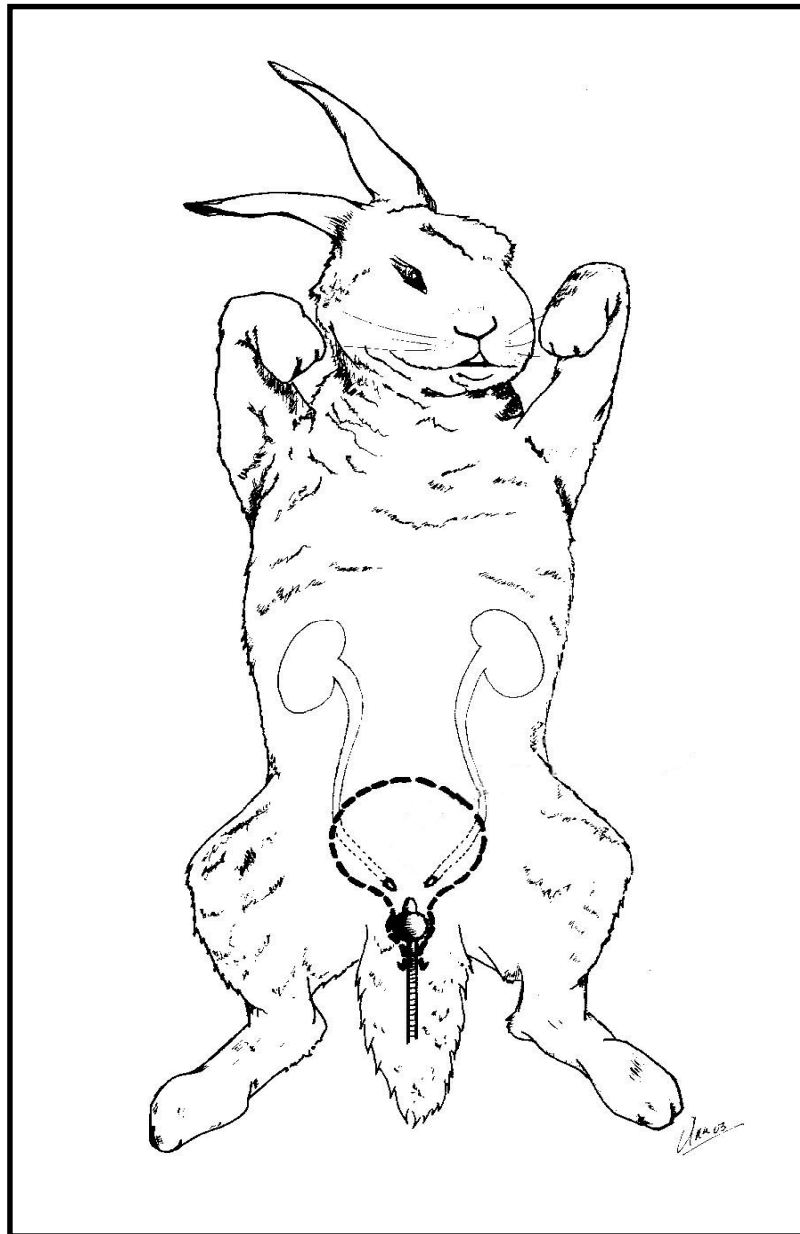


Figura 4. Dibujo esquemático de la cateterización vesical introduciendo la sonda por la uretra.

Uno de los principales problemas cuando utilizamos un modelo isovolumétrico, es conseguir que no varíe el volumen vesical durante todo el estudio cistométrico y que ese volumen sea el mismo en todos los animales que se estudien. Para evitar cambios en el volumen vesical por la entrada fisiológica de líquido procedente de los riñones a través de los uréteres, se ha propuesto controlar esa diuresis privando al animal de bebida unas horas

antes del estudio y restringiendo al mínimo la perfusión de suero intravenoso. Con este mismo propósito, varios grupos seccionan ambos uréteres dejando que drenen al exterior, evitando ligarlos para no provocar posibles reflejos que interfieran en la función vesical a través de un incremento de la presión en la pelvis renal (97,116,118,123).

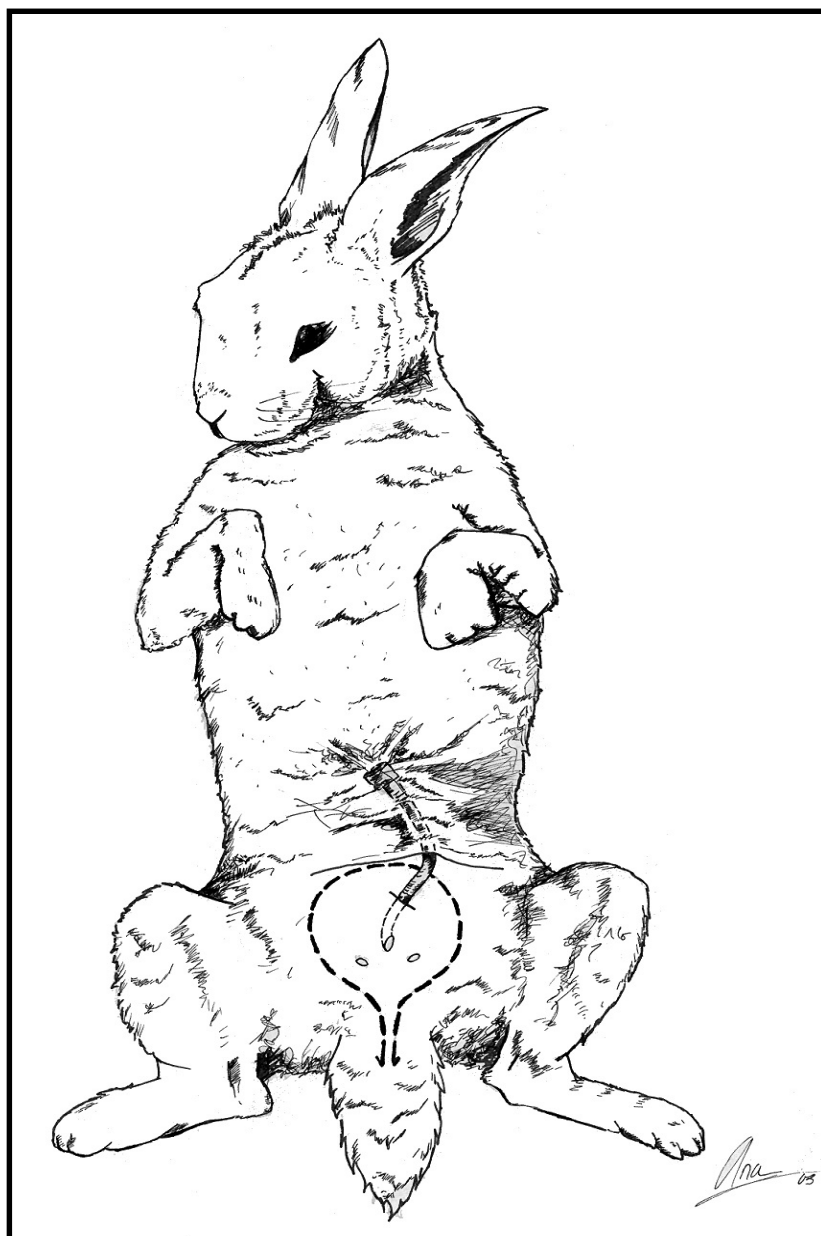


Figura 5. Dibujo esquemático de la cistostomía subcutánea en conejos.



Por otro lado, para no perder líquido en las contracciones, podemos ligar la uretra proximal con una doble sutura, cortando entre medias para independizar la vejiga de la uretra y así evitar interferencias mecánicas (107,108,110,124). También podemos realizar una cistostomía subcutánea con balón para realizar estudios isovolumétricos, controlando de forma segura el volumen vesical (Fig. 6B).

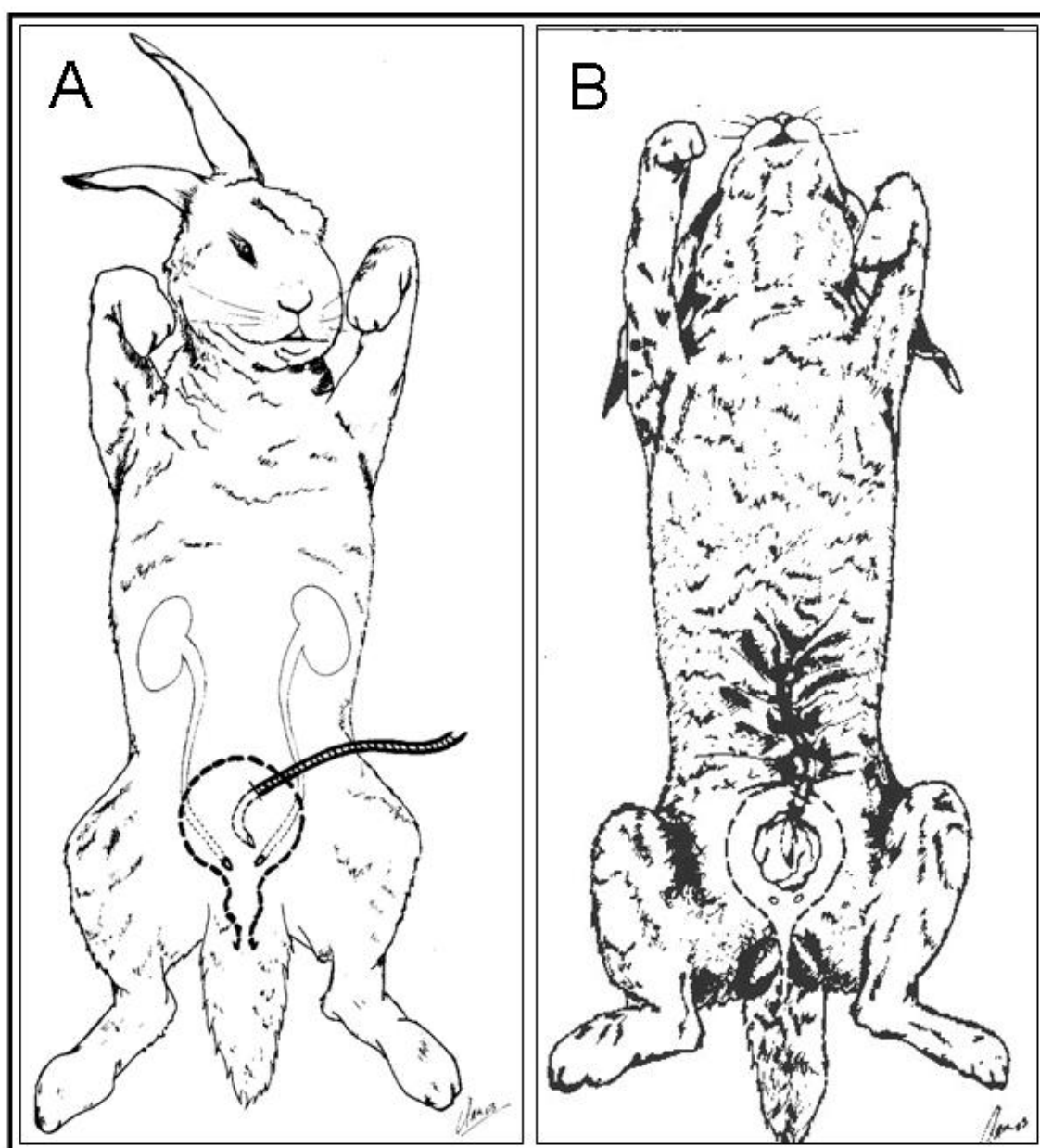


Figura 6. Dibujos esquemáticos de (A) una cistostomía, para realizar estudios de infusión continua con el abdomen abierto, y (B) de una cistostomía subcutánea con balón, para realizar estudios isovolumétricos.



La **cistostomía subcutánea** es un método ampliamente utilizado que permite el estudio de la función vesical sin que haya interferencias a nivel uretral, dando generalmente, buenos resultados (112,126-148). Este procedimiento permite realizar estos estudios cistométricos con el animal despierto, sedado o anestesiado.

Debido a las dificultades que plantean los **modelos isovolumétricos**, y a la similitud encontrada entre los **modelos de infusión continua** y la dinámica miccional fisiológica, estos últimos modelos animales parecen dar más información y más ajustada a la fisiología miccional.

Las especies animales más comunes en este tipo de investigaciones son ratas (Sprague-Dawley o Wistar), conejos (New Zealand White Rabbits), gatos, perros y cerdos. De todas estas especies animales, el conejo posee un tamaño idóneo y un precio razonable, por lo que se considera la especie de elección para la investigación farmacológica de la dinámica miccional (149).

## **1.5 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DE LA INCONTINENCIA URINARIA**

La combinación de inestabilidad y el consecuente fallo en la contractilidad del detrusor está frecuentemente presente en personas con IU (1). Esta combinación es a menudo difícil de tratar farmacológicamente porque los tratamientos convencionales suelen producir numerosos efectos secundarios que desembocan en el abandono terapéutico, y esto hace que frecuentemente, estos pacientes no encuentren una solución eficaz a su problema de IU (1).

La **rehabilitación del suelo pélvico** fue descrita por primera vez en 1966 (150), pero es un proceso que aunque parezca simple, requiere mucha motivación y gran fuerza de voluntad para que llegue a ser efectiva. Por ello,

normalmente se combina con terapia farmacológica, sólo recomendándose la **cirugía** si fracasan ambos tratamientos.

La mayoría de las mujeres empiezan a padecer IU a los 40 o 50 años, por lo que se creyó oportuno investigar la relación existente entre la depleción de estrógenos en la menopausia y la pérdida involuntaria de orina (151). De este modo, se ha visto que los **estrógenos** mejoran síntomas como pérdidas de orina, nocturia, urgencia y aumento de la frecuencia miccional. Sin embargo, recientes revisiones críticas sobre este tema, sugieren que el papel de los estrógenos en el tratamiento de la IU de esfuerzo es limitado (152-154). Por otro lado, se ha visto que la combinación de **estrógenos y progesterona**, tiene efectos beneficiosos sobre la IU femenina (151), y también se ha mostrado que el empleo de estrógenos puede aumentar la sensibilidad de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en el cuello vesical y en la uretra. Así, se ha visto una mejoría de estos pacientes, al emplear una terapia conjunta de **estrógenos y un agonista  $\alpha$ -adrenérgico** como, por ejemplo, estradiol y fenilpropanolamina (151).

Estudios sólo con **agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos**, como efedrina, pseudoefedrina, fenilpropanolamina y propanolamina, han mostrado su eficacia en el tratamiento de la IU de esfuerzo, aunque sus efectos cardiovasculares adversos los hacen fármacos no recomendables para este fin (155).

### 1.5.1 ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS

Los ATs son derivados del núcleo iminodibencilo, y el fármaco prototipo de este grupo terapéutico es la **imipramina**, que también es el fármaco de la familia de los ATs que más ha sido estudiado. Ligeras modificaciones en su cadena lateral y/o en su anillo central dan lugar al resto de componentes (156).

Todos los ATs poseen en mayor o menor medida, además del efecto farmacológico como sedantes, efectos sobre los mecanismos neurohumorales que participan en la micción. De acuerdo con conocimientos tradicionales basados en investigaciones experimentales y clínicas (157,158), se supuso que los mecanismos por los que los ATs estimulaban la continencia urinaria eran 1) un **efecto antimuscarínico** directo sobre el músculo vesical que explicaba la relajación del detrusor, y 2) un **efecto a través de la NE**, estimulando los receptores adrenérgicos situados tanto en el detrusor, principalmente  $\beta$ -adrenérgicos, así como en el trigono vesical y en la uretra proximal, fundamentalmente poblada por receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos (157). Es decir, que por un lado el efecto consistía en relajar el detrusor, y por otro lado, en contraer el EUI, facilitando la continencia.

En los últimos años, un potente efecto inhibitorio sobre la musculatura vesical, aparentemente relacionado con receptores no adrenérgicos-no colinérgicos (NANC), ha podido ser comprobado experimentalmente. Se ha descrito también un efecto sobre los receptores  $\alpha 2$ -adrenérgicos presinápticos, presumiblemente tanto a nivel del SNC como periférico (en el plexo de neuronas cortas que rodean el área vesicouretral). Junto a estas observaciones, actualmente se piensa que los ATs pueden actuar de manera multifocal sobre la dinámica miccional, aunque el principal efecto lo producen a nivel medular, donde inhiben la recaptación de 5-HT y NE en el núcleo de Onuf (159).

**Imipramina**, al igual que el resto de ATs, se utilizó como antihistamínico, luego como antipsicótico y ahora se utiliza principalmente por sus propiedades antidepresivas (160). Además, la imipramina puede ser prescrito para tratar el dolor crónico y también es un fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de la enuresis y la IU de esfuerzo femenina (52,127,161-164), aunque debido a los efectos secundarios que produce no es una opción muy recomendable en niños y ancianos. El mecanismo por el que produce estos efectos beneficiosos en el tratamiento de la IU no se conocen en profundidad, aunque además de los efectos clásicos de la

familia de ATs, las nuevas aportaciones a la dinámica continencia/micción consideran que la imipramina puede inhibir la recaptación de 5-HT y NE en el núcleo de Onuf y potenciar la contractilidad del EUE, favoreciendo así la continencia urinaria. Hay otros estudios que, por el contrario, aunque la observación clínica demuestre que la mayoría de estos fármacos producen sequedad de boca y otros efectos antimuscarínicos en distintos órganos, muestran que ATs como imipramina o clomipramina parecen no tener un efecto anticolinérgico significativo en el detrusor (151).

Los efectos de imipramina sobre la IU de esfuerzo han sido estudiados en 2 ensayos clínicos y ambos mostraron algunos efectos beneficiosos para tratar esta patología (165,166). Sin embargo, se vieron efectos secundarios que a veces desaconsejaron su empleo.

**Clomipramina** es otro AT ampliamente utilizado como antidepresivo desde hace muchos años, pero no es muy extendida su utilización en la IU de esfuerzo femenina. Clomipramina se caracteriza por su potente efecto inhibiendo la recaptación de 5-HT, teniendo un efecto similar a los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT, entre los que se encuentra la fluoxetina (160,167). Los otros dos ATs cuyos efectos sobre la dinámica miccional hemos evaluado en esta tesis doctoral, **doxepina** y **amitriptilina**, tampoco han sido muy utilizados en el tratamiento de la IU de esfuerzo, pero hay ciertos estudios en los que se muestra que tienen efectos sobre el TUI (10,168-172).

Una limitación al uso de los ATs la encontramos en los severos efectos secundarios que pueden producir. Estos efectos adversos se atribuyen a todos los fármacos de esta familia de antidepresivos y están relacionados con sus propiedades bioquímicas, por lo que en cierta medida pueden considerarse predecibles. La combinación de efectos adrenérgicos y anticolinérgicos en el organismo, entre otros, puede provocar que aparezcan en los pacientes tratados con esta familia de antidepresivos unos efectos secundarios tan variados como estreñimiento, sequedad de boca, trastornos

de la acomodación visual, crisis de glaucoma, trastornos de memoria, manifestaciones en forma de bloqueo de la palabra, confusión, delirio, alteraciones cardíacas y hemodinámicas, aumento de peso, agitación, insomnio, temblor, trastornos en la función sexual y efectos teratógenos (10).

### 1.5.2 INHIBIDORES DUALES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA Y NOREPINEFRINA

El **tratamiento de la IU de esfuerzo femenina** está limitado al entrenamiento de los músculos del suelo pélvico, varios tipos de dispositivos, cambios de comportamiento o a la cirugía. Actualmente, duloxetina, un inhibidor dual de la recaptación de 5-HT y NE (SNRI) (173,174), ha sido aprobada en Europa como tratamiento específico de la IU de esfuerzo femenina, por producir efectos similares a los ATs pero con menos efectos secundarios, aunque también es cierto que sobre un 12% de los pacientes participantes en ensayos clínicos con duloxetina han abandonado el tratamiento, principalmente por náuseas y fatigas (48-51,175-177). Otros efectos secundarios que se han observado son insomnio, somnolencia, diarrea y vértigo. Por otro lado, la investigación de nuevos tratamientos más efectivos y seguros para evitar la pérdida involuntaria de orina, está en auge.

La familia de los antidepresivos SNRIs está formada por tres fármacos: **venlafaxina**, **milnacipran** y **duloxetina**. Estos antidepresivos bloquean con diferente selectividad la recaptación de aminas neurotransmisoras como 5-HT y NE a nivel del SNC. Mientras milnacipran bloquea la recaptación de 5-HT y NE de una manera similar, duloxetina y venlafaxina tienen 10 y 30 veces más selectividad por 5-HT, respectivamente (178). Duloxetina incrementa la actividad del esfínter estriado a través de un efecto central actuando en la médula espinal, contribuyendo a la continencia urinaria (10,53). Además, muestra una débil o no apreciable afinidad por otros receptores, entre los que se encuentran los muscarínicos, histaminérgicos (tipo 1A, 1B, 1D, 2A y 2C),  $\alpha$ 1-adrenérgicos,  $\alpha$ 2-adrenérgicos, dopaminérgicos tipo 2 y opioides (173,174,179,180). La

habilidad de duloxetine para estimular las neuronas motoras pudendas e incrementar la contractilidad del esfínter estriado es la base para su eficacia en mujeres con IU de esfuerzo (54).

Estudios animales, han evidenciado la implicación de 5-HT y NE en el control neurológico del TUI (52,53,173,174). En gatas, se ha visto que agonistas serotoninérgicos, inhiben la actividad parasimpática y potencian la actividad simpática y somática, efectos que producen un incremento en la CV y de la actividad EMG-EUE (53). Los agonistas noradrenérgicos tienen diferente efecto dependiendo del grupo de adrenorreceptores sobre los que actúen.

Las neuronas motoras que inervan el EUE, que salen del núcleo de Onuf y que a través del nervio pudendo llegan al rabdoesfínter y a otras localizaciones, son más sensibles a los efectos de 5-HT y NE que otras motoneuronas, ya que exhiben mayor densidad de neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas que otros núcleos motrices espinales (24,181,182). Además, hay estudios que han demostrado que los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos y los serotoninérgicos en el núcleo de Onuf, facilitan la contracción del esfínter estriado (12,21,24,28,29).

### 1.5.3 ANTIMUSCARÍNICOS

Los fármacos con propiedades antimuscarínicas actúan en la fase de llenado, aumentando la CV y disminuyendo la urgencia, por lo que han sido la principal alternativa terapéutica para la inestabilidad del detrusor y para la IU de urgencia (183). Estos fármacos anticolinérgicos inhiben la contractilidad vesical por bloqueo selectivo de la Ach en los receptores postsinápticos. En 1936, se propuso la belladona como terapia para controlar la urgencia y la frecuencia miccional. Más tarde, el primer antimuscarínico utilizado para este fin fue la atropina, aunque debido a su potencia, producía graves efectos secundarios (184,185). Recientemente, se ha investigado la administración intravesical de atropina con buenos

resultados, reduciéndose considerablemente los efectos secundarios (186-188). La **oxibutinina** es una amina terciaria con múltiples efectos, incluyendo un efecto antiespasmódico, relajante muscular, anestésico local, anticolinérgico y antihistamínico, y que ha demostrado ser un tratamiento efectivo para aliviar los síntomas que acompañan a la IU de urgencia y a la inestabilidad del detrusor (189-191).

La oxibutinina es un fármaco eficaz para tratar la hiperactividad vesical, pero cuya administración oral se asocia con una alta incidencia de efectos secundarios, entre los que destaca la sequedad de boca, aunque también produce disfagia, úlceras de estómago, visión borrosa, diarrea, constipación, distensión abdominal, náuseas, dolores de cabeza, mareos y somnolencia (151,192-194). Está claro que los **efectos secundarios** son un factor limitante en el uso de oxibutinina, por ello, se han investigado nuevos fármacos cada vez más selectivos.

#### 1.5.4 NUEVOS TRATAMIENTOS PARA LA INCONTINENCIA DE ESFUERZO

Besipirdina (HP-749) y otros análogos que son N-(4-pyridinyl)-1H-indol-1-aminas, han demostrado su eficacia en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer (195-198). Besipirdina es un fármaco experimental que ha demostrado tener efectos inhibidores de la recaptación de 5-HT y NE a nivel del SNC, y también se ha visto que es un agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico y un antagonista  $\alpha 2$ -adrenérgico (199-203). Además, besipirdina es también un bloqueante de canales de sodio y potasio voltaje-dependientes (201,204,205), y tiene afinidad por varios tipos de receptores como 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>1b</sub>, 5-HT<sub>2a</sub> (205,206), dopaminérgicos y muscarínicos M<sub>3</sub> (203). De hecho, también se está investigando su posible utilización como antidepresivo.

HP-748, también denominado P7480 o HP 148, es el principal metabolito de besipirdina (207-209), y se produce por N-dealquilación. Este

metabolito muestra un potente antagonismo sobre receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y propiedades agonistas por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (205,208,209), actuando a nivel periférico directamente sobre el órgano donde ejerce cambios funcionales.



## **II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1 JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, la IU afecta a más de 2 millones de personas en España y a cerca de 50 millones en todo el mundo. Es más frecuente en las mujeres que en los hombres. La IU de esfuerzo consiste en la pérdida de orina al realizar cualquier movimiento o actividad física, y afecta a más de 1 millón de mujeres.

Sobre la base de la experiencia clínica y la literatura publicada sobre la importancia de la 5-HT y la NE en la dinámica miccional (99,210,211), se decidió seleccionar diversos fármacos, clásicos y novedosos, con la característica común de ser potentes inhibidores de la recaptación de 5-HT y NE en el SNC, ya que todos estos fármacos, teóricamente, pueden favorecer la continencia urinaria principalmente incrementando la contractibilidad del EUE, aunque, en mayor o menor grado, también poseen un efecto a nivel vesical, ya sea por este mismo mecanismo o por otros mecanismos de acción que posean. A estos fármacos, se le añadió el estudio de oxibutinina, un anticolinérgico no selectivo con el que se quiso evaluar su efecto sobre parámetros cistométricos y electromiográficos a través de un mecanismo de acción periférico, inhibiendo la actividad de Ach a este nivel.

La familia de los ATs posee mecanismos de acción comunes que favorecen la continencia urinaria, por lo que se han utilizado clásicamente para el tratamiento de ciertos tipos de IU. Sin embargo, debido a los marcados efectos secundarios que producen, se intentan buscar alternativas terapéuticas para la IU de esfuerzo femenina, desarrollando nuevos fármacos que estimulen la actividad del EUE, pero que no posean efectos anticolinérgicos marcados, responsables de la mayoría de los efectos secundarios producidos por los ATs.

## **2.2 HIPÓTESIS**

Pretendemos demostrar que los ATs, los SNRIs y otros fármacos cuyo principal mecanismo de acción en el TUI es la inhibición de la recaptación de 5-HT y NE en el núcleo de Onuf, producen un efecto relajante sobre la vejiga y estimulan la actividad del esfínter estriado, favoreciendo el almacenamiento de orina en condiciones irritativas. La comparación entre este tipo de fármacos y oxibutinina, un antimuscarínico no selectivo, nos orientará sobre los mecanismos implicados en el mantenimiento de la continencia urinaria.

## **2.3 OBJETIVOS**

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido realizar la valoración farmacológica específica a nivel del TUI de compuestos clásicos tales como los ATs (Clomipramina, Imipramina, Doxepina y Amitriptilina) y los anticolinérgicos (Oxibutinina), de nuevos compuestos como los SNRIs (Duloxetina y Milnacipran) y de otros fármacos cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la recaptación de 5-HT y NE (Besipirdina y su metabolito HP-748), considerados como fármacos de potencial interés para el tratamiento de la IU de esfuerzo femenina.

La utilización de los modelos animales adecuados para determinar la eficacia de estas moléculas está en función del tipo de IU que se pretenda estudiar. Para ello hemos tenido que desarrollar un modelo animal adecuado para la IU de esfuerzo femenina con el que evaluar simultáneamente el efecto a nivel vesical y a nivel del esfínter estriado. Los objetivos concretos han sido:

- **Validar un modelo animal** que permite estudiar simultáneamente la respuesta vesical (detrusor) y esfinteriana.

- **Determinar** la **actividad *in vivo*** de clomipramina, imipramina, doxepina, amitriptilina, duloxetina, milnacipran, oxibutinina, besipirdina y su metabolito HP-748 en el TUI, con un modelo animal **en conejos hembras**.
- **Evaluar** la **eficacia** de **duloxetina** y **clomipramina** para promover la continencia urinaria **en conejos machos y hembras**, estudiados **en condiciones normales e irritativas**.
- **Comparar** el efecto sobre el TUI de **ATs** (Clomipramina, Imipramina, Doxepina y Amitriptilina), de **SNRIs** (Duloxetina y Milnacipran), de **Besipirdina** y su metabolito **HP-748**, y de un **antimuscarínico** no selectivo (Oxibutinina).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 ANIMALES**

Se han utilizado conejos blancos de Nueva Zelanda (New Zealand white rabbits) hembra, de 3 a 3,5 Kg de peso, para el estudio del efecto de los diversos compuestos evaluados en esta Tesis Doctoral (un total de 128 conejos, 96 hembras y 32 machos).

Para el estudio de duloxetina y clomipramina, se han separado los animales en ocho grupos de 8 animales cada uno, siendo estudiados ambos fármacos en conejos machos y hembras, con un modelo de “normalidad” vesical (infusión constante intravesical de suero salino) y con otro modelo de irritabilidad vesical (infusión constante intravesical de ácido acético al 0,5%) (53).

Cada uno del resto de compuestos -suero salino, imipramina, doxepina, amitriptilina, milnacipran, oxibutinina, besipirdina y su metabolito HP-748- se han evaluado únicamente en un grupo de 8 conejos hembra con un modelo de irritación vesical infundiendo la vejiga con ácido acético al 0,5%.

Este estudio *in vivo* en animales ha sido aprobado por el comité ético y de cuidado animal de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

### **3.2 COMPUESTOS Y SOLUCIONES**

Un catéter se insertó en la vena marginal de la oreja para la administración intravenosa (IV) de los compuestos estudiados (Fig. 7). Estos compuestos fueron preparados justo antes de su administración disolviéndolos en suero salino, para alcanzar una concentración final de 1 mg/Kg por mililitro de solución. La dosis adecuada de cada compuesto fue administrada IV, y se continuó con la administración de un mililitro de suero salino, para asegurarnos de que se administraba completamente la dosis correspondiente.



Figura 7. Cateterización de la vena marginal de la oreja del conejo, para la administración de los distintos compuestos estudiados.

Los compuestos estudiados han sido:

**Clorhidrato de Clomipramina**, es un AT, se utilizó la forma comercial Anafranil (25mg/2ml), suministrada por Novartis. Se estudió en 4 grupos de animales: conejos hembras y machos, ambos bajo condiciones de “normalidad” y de irritación vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg.

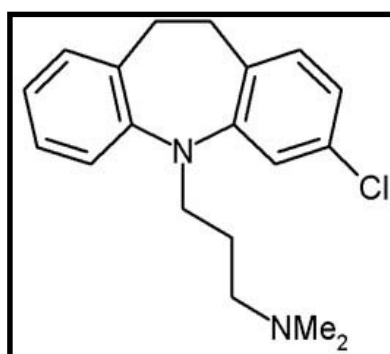


Figura 8. Estructura química de Clomipramina.

**Imipramina**, es el fármaco representativo de la familia de los ATs. Se estudió en 1 grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad

vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg. Suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis).

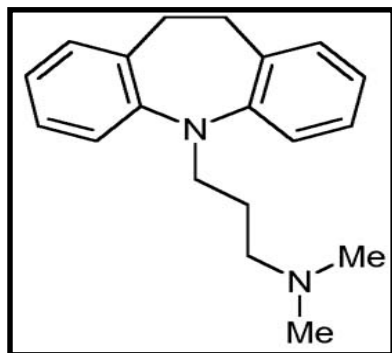


Figura 9. Estructura química de Imipramina.

**Doxepina**, es un AT. Se estudió en 1 grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg. Suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis).

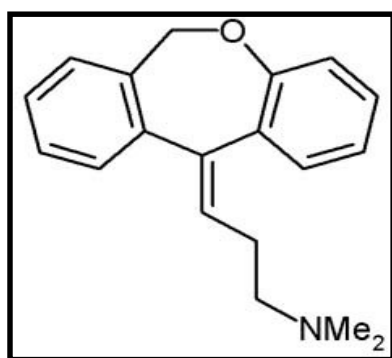


Figura 10. Estructura química de Doxepina.



**Amitriptilina**, es un AT. Se estudió en 1 grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg. Suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis).

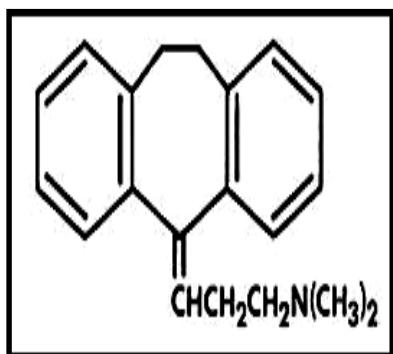


Figura 11. Estructura química de Amitriptilina.

**Duloxetine**, es el fármaco representativo de la familia de los SNRIs, cedido gratuitamente por Urogene (Francia). Se estudió en 4 grupos de animales: conejos hembras y machos, ambos bajo condiciones de “normalidad” e irritativas. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg.

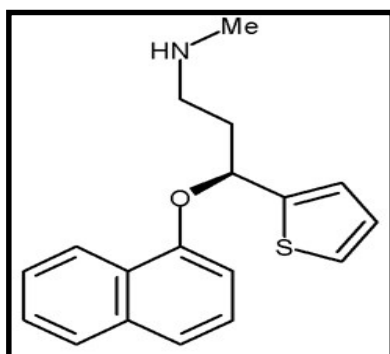


Figura 12. Estructura química de Duloxetina.

**Milnacipran**, es un fármaco perteneciente a la familia de antidepresivos SNRIs, cedido gratuitamente por Pierre Fabre (Francia). Se estudió en 1

grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg y 2 mg/Kg.

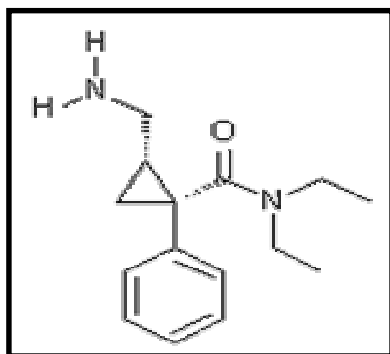


Figura 13. Estructura química de Milnacipran.

**Oxibutinina**, es un anticolinérgico no selectivo. Se estudió en 1 grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 0,1 mg/Kg, 0,2 mg/Kg y 0,3 mg/Kg. Suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis).

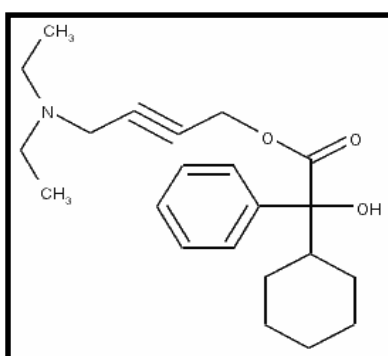


Figura 14. Estructura química de Oxibutinina.

**Besipirdina**, representa un nuevo fármaco cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la recaptación de 5-HT y NE, cedido gratuitamente por Urogene (Francia). Se estudió en 1 grupo de conejos

hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 1 mg/Kg, 3 mg/Kg y 5 mg/Kg.

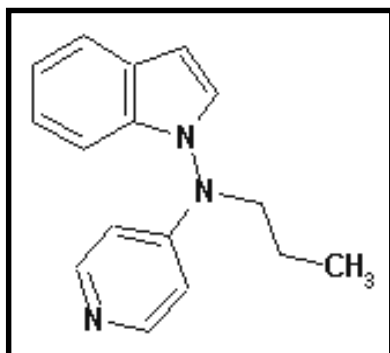


Figura 15. Estructura química de Besipirdina.

**HP-748**, es el principal metabolito de besipirdina, cedido gratuitamente por Urogene (Francia). Se estudió en 1 grupo de conejos hembras en condiciones de irritabilidad vesical. Las dosis estudiadas fueron 0,3 mg/Kg, 1 mg/Kg y 3 mg/Kg.

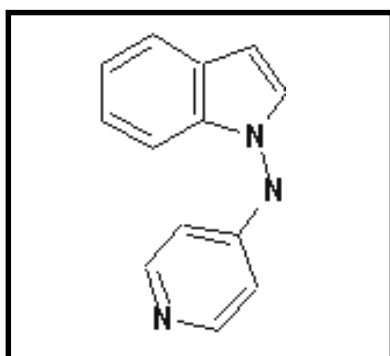


Figura 16. Estructura química del metabolito HP-748.

**Suero salino fisiológico**, fue el compuesto administrado como placebo. Se estudió en cada experimento antes de la primera dosis del fármaco a estudiar. En otro grupo de 8 animales hembra bajo condiciones de irritabilidad vesical, 3 dosis de 1 ml de suero salino se administraron consecutivamente en el mismo animal.

### **3.3 CATETERIZACIÓN VESICAL EN CONEJOS MACHOS**

La implantación del catéter para acoplar, por un lado, un transductor de presión, y por otro, una bomba de infusión se ha realizado mediante una cateterización vesical a través de la uretra de los machos (Fig. 4). Los animales se anestesiaron con halotano al 2-3% (Fluothane, Zeneca Farma, Pontevedra, España). Luego un catéter 8F (AH5110, Porges, Barcelona, España) se introdujo transuretralmente hasta la vejiga y se fijó para evitar su movimiento.

### **3.4 CISTOSTOMÍA SUBCUTÁNEA EN CONEJOS HEMBRAS**

Los conejos se anestesiaron intramuscularmente (IM), con una combinación de ketamina (Ketolar, Parke Davis, Barcelona, España, 25 mg/Kg) y xilacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Alemania, 10 mg/Kg), y un catéter 8F de polietileno con un tapón multiperforable en uno de sus extremos se insertó, abriendo al animal por la línea alba, dentro del cuerpo vesical y se fijó a la pared vesical con una sutura en forma de bolsa de tabaco (Figs. 5 y 17). Luego, el catéter se tunelizó subcutáneamente y se fijó, por el extremo donde se sitúa el tapón multiperforable, a la piel del animal con un nudo simple (104). Después de la cirugía, el animal se depositó en su jaula para recuperarse de la anestesia y se trató convenientemente para evitar infecciones durante 2 días consecutivos (trimetoprima-sulfametoxazol, Soltrim inyectable, Almirall Prodesfarma, 80 mg/kg/día IM).



Figura 17. Cirugía para realizar la Cistostomía Subcutánea en conejos blancos de Nueva Zelanda hembra.



Figura 17 **(Continuación)**. Cirugía para realizar la Cistostomía Subcutánea en conejos blancos de Nueva Zelanda hembra.



### **3.5 ESTUDIO CISTOMÉTRICO**

La cistometría (Fig. 18) se realizó inmediatamente después de la implantación transuretral del catéter en los conejos machos y 3 días después de la cistostomía subcutánea en las hembras (para permitir que la vejiga se recuperara de la cirugía). La realizamos con el animal anestesiado con halotano al 2-3% (Fig. 19). Se utilizó una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal del animal durante todo el experimento. Al catéter insertado en la vejiga (Fig. 20) -acoplando una vía de tres pasos en conejos hembra-, por un lado se conectó un transductor de presión TRA021 de Letica (Fig. 21A) que se utilizó para recoger los cambios de presión vesical durante el cistometrograma (CMG); y por otro se conectó una bomba de infusión (Razel, España, Fig. 21B) que la utilizamos para la infusión intravesical continua de líquido (1,4 ml por minuto).



Figura 18. Modelo urodinámico en conejos blancos de Nueva Zelanda realizado en el Quirófano de Cirugía Experimental de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.



Figura 19. Máquina anestésica utilizada en los estudios urodinámicos en conejos.

El volumen miccional (VM) se midió por medio de un colector de líquido conectado a un transductor de fuerza (ADInstruments, PanLab, Barcelona, España). El CMG y el VM se registraron en un PowerLab 4/25 (ADInstruments, PanLab S.A., Fig. 22) de forma continua durante todo el experimento, a la vez que infundimos líquido a temperatura ambiente en la vejiga a una velocidad constante, para recoger un número de ciclos continencia/micción relativamente elevado en relativamente poco tiempo.

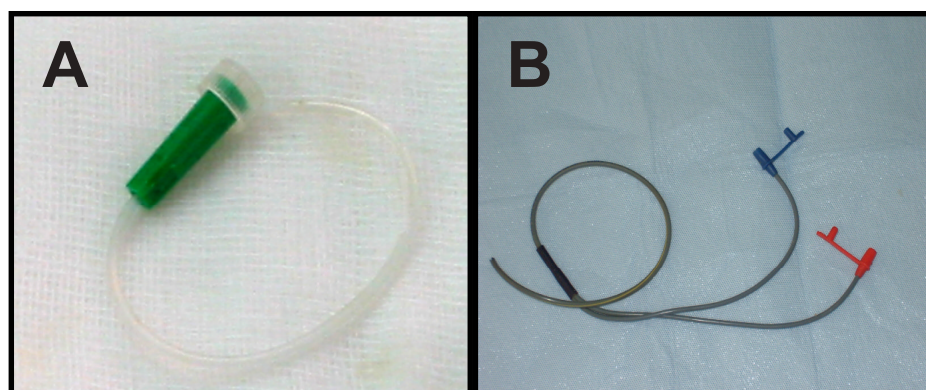


Figura 20. Sondas para cateterizar la vejiga en (A) conejos hembra mediante una cistostomía subcutánea y (B) conejos machos mediante cateterización transuretral.



Primero, con la vejiga vacía, empezamos a infundir líquido durante al menos 60 minutos para estabilizar los ciclos continencia/micción, luego se administró por la vena marginal de la oreja un placebo (suero salino). Tras comprobar que la dinámica miccional estaba estabilizada, se administraron consecutivamente las dosis progresivas del fármaco correspondiente. Estas dosis se administraron con un intervalo de 40 minutos entre cada administración. Los efectos de cada dosis se registraron durante 40 minutos, aunque el análisis se hizo de sólo 30 minutos, empezando a los 10 minutos de la administración del compuesto.

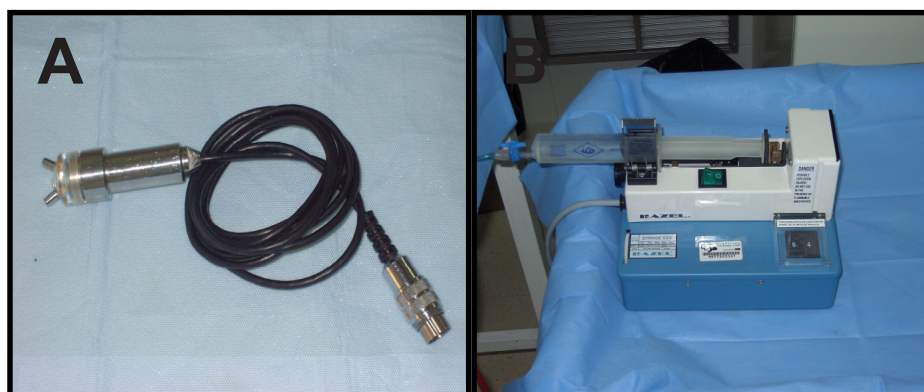


Figura 21. (A) Transductor de presión TRA021 de Letica y (B) bomba de infusión Razel.

En un grupo de 8 animales hembra, no se administraron dosis progresivas de ningún compuesto, sino que se administró suero salino en 3 ocasiones, para comprobar si el modelo animal era estable en el tiempo, o por el contrario, se producían cambios atribuibles al efecto de un placebo.

En resumen, la Figura 23 muestra los protocolos que se han utilizado para el estudio urodinámico de cada uno de los compuestos estudiados.



Figura 22. PowerLab 4/25 y dos amplificadores, uno para amplificar la señal electromiográfica y otro para amplificar la señal procedente del transductor de fuerza utilizado para medir el volumen miccional.

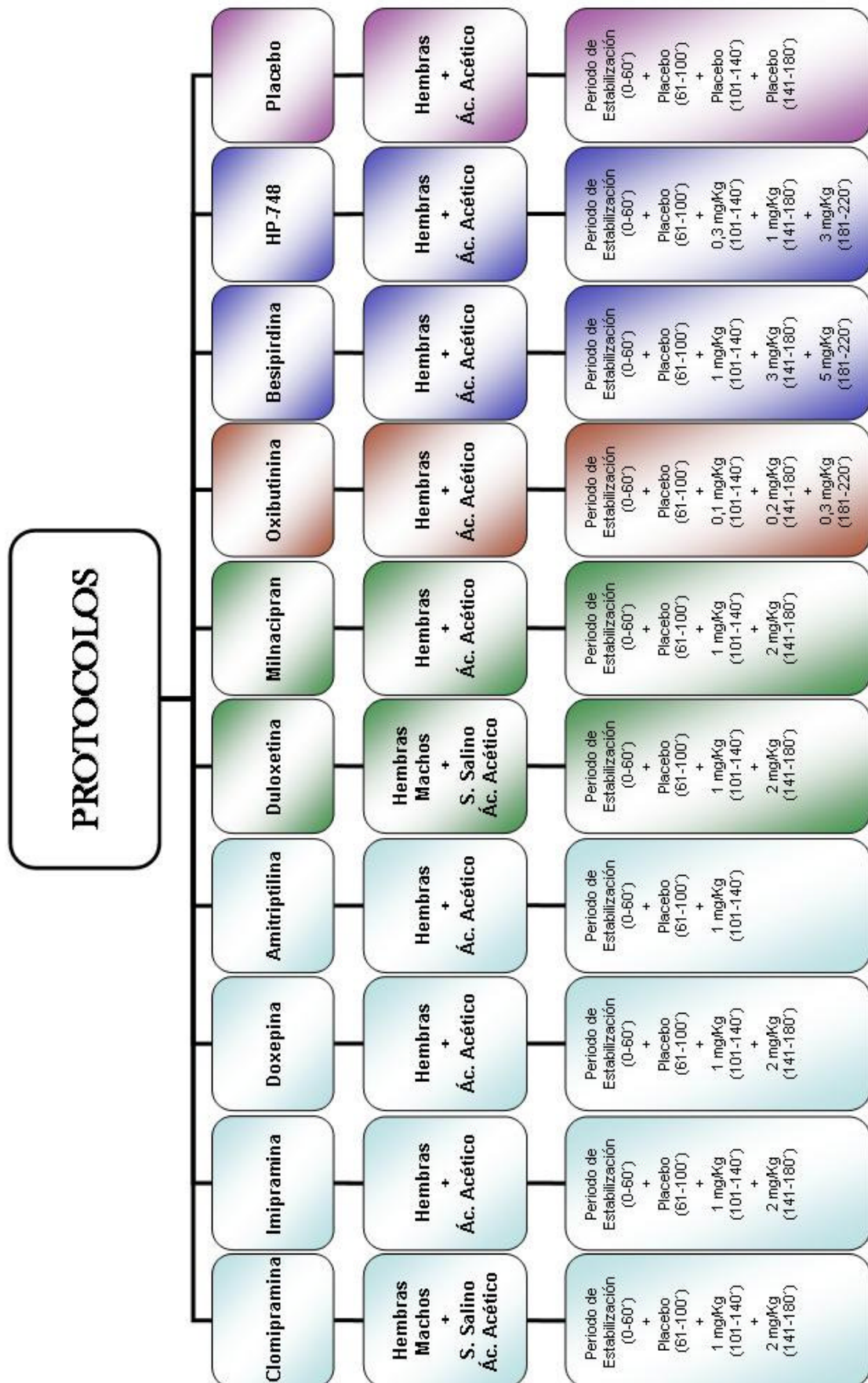


Figura 23. Protocolo de los estudios urodinámicos realizados con cada uno de los compuestos analizados en esta Tesis Doctoral.

### **3.6 PARÁMETROS CISTOMÉTRICOS**

Los parámetros cistométricos estudiados en todos o parte de los estudios fueron:

**Capacidad vesical (CV):** Volumen residual tras el vaciamiento mas el volumen de líquido infundido hasta el momento en el que se produce la micción siguiente. El efecto sobre este parámetro fue valorado con todos los compuestos estudiados.

**Presión vesical (PV):** La presión media de la vejiga durante el llenado vesical. El efecto sobre este parámetro fue valorado con todos los compuestos estudiados.

**Amplitud de la contracción miccional (AM):** La máxima presión vesical durante la micción menos la presión vesical registrada justo antes de iniciarse la micción. El efecto sobre este parámetro fue valorado con todos los compuestos estudiados.

**Duración de la contracción miccional (DM):** Periodo de tiempo que dura la contracción miccional. El efecto sobre este parámetro fue valorado con todos los compuestos estudiados.

**Intervalo entre contracciones miccionales (IEM):** Periodo de tiempo entre dos micciones consecutivas. El efecto sobre este parámetro fue valorado con todos los compuestos estudiados.

**Volumen miccional (VM):** Volumen de líquido expulsado en la micción. El efecto sobre este parámetro sólo fue valorado en los estudios realizados en conejos hembras bajo condiciones de irritación vesical, a excepción de cuando se estudió el efecto de clomipramina (no se midió el VM).

### **3.7 ESTUDIO ELECTROMIOGRÁFICO**

La electromiografía la realizamos de forma simultánea a la cistometría, y para ello colocamos dos electrodos de aguja 30G (ADInstruments, PanLab, Barcelona, España) en el EAE, a unos 5-10 milímetros del orificio anal. Estos electrodos se conectaron a un amplificador ML136 (ADInstruments, PanLab, Barcelona, España) y un PowerLab 4/25, que nos permitieron registrar la actividad electromiográfica y poder realizar el análisis de los datos de forma detallada. La señal fue filtrada por debajo de 1 Hz y por encima de 5 Hz y la actividad electromiográfica del esfínter anal estriado (EMG-EAE) se midió durante el llenado vesical y no durante la micción, ya que es corriente registrar ruido debido al movimiento perineal durante la micción.

En la literatura se recoge que la inervación del nervio pudiendo llega al EUE y al EAE, como también se confirma la asociación entre la vejiga y ambos esfínteres (212-214). Además, hay artículos en donde ambos esfínteres han sido estudiados simultáneamente, y en los que se han obtenido mediciones electromiográficas similares de ambos (213-215). Todos estos estudios previos dan evidencias convincentes de que la actividad EMG-EAE puede ser utilizada para medir la actividad EMG-EUE de forma indirecta.

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los valores se han expresado como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La PV tras la administración del placebo se consideró cero, y este parámetro, tras la administración de los diferentes compuestos, se evaluó en cmH<sub>2</sub>O. El resto de parámetros cistométricos y electromiográficos tras la administración inicial del placebo se consideraron como 100% y el resto de valores se expresaron con respecto a ese valor. Se realizaron los análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos *in vivo* mediante análisis estadísticos no paramétricos (Wilcoxon rank test, Mann-Whitney U test), utilizando para ello el paquete estadístico SPSS versión 13.0.  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

#### **IV. RESULTADOS**



## **4.1 RESULTADOS**

Se obtuvieron ciclos miccionales repetidos al infundir líquido a una velocidad constante en la vejiga. En condiciones de irritación vesical (bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%), la CV, la DM y el IEM disminuyeron con respecto a las condiciones de “normalidad” (bajo infusión intravesical de suero salino), tanto en machos como en hembras. También hemos comprobado que no se produjeron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros cistométricos y electromiográficos estudiados, tras la administración de las 3 dosis consecutivas del placebo (Fig. 24). Por otra parte, al comparar estos parámetros medidos tras la dosis de placebo inicial que se administró en cada experimento, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos en los que se separaron los animales para el estudio de los diferentes compuestos.

Las Tablas I-IV muestran los valores medios  $\pm$  EEM, registrados en cada uno de los parámetros cistométricos y electromiográficos estudiados, tras la administración de las distintas dosis de los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral.

## **4.2 ESTUDIO DE CLOMIPRAMINA**

Clomipramina se estudió a dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg en conejos machos y hembra bajo infusión intravesical de suero salino o de ácido acético al 0,5%.

En condiciones irritativas, clomipramina tras 2 mg/Kg en los conejos machos y de forma dosis-dependiente en las hembras, incrementó la CV, la DM y el IEM, y redujo la PV. La actividad EMG-EAE en conejos machos en



condiciones de irritación vesical no aumentó significativamente, mientras que en hembras el efecto de clomipramina fue dosis-dependiente.

En machos y hembras en condiciones de “normalidad”, en contra de lo que ocurre en condiciones de irritación vesical, la administración de clomipramina no produjo ningún cambio significativo ni en los parámetros cistométricos ni en la actividad EMG-EAE.

Tabla I. Activiad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE).

		PARÁMETRO ELECTROMIOGRÁFICO			
		EMG-EAE			
		Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)
CLOMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	210,1 ± 33,5 *	305,0 ± 44,0 *	N/E
	HEMBRAS SALINO	100	128,2 ± 41,4	104,2 ± 21,7	N/E
	MACHOS ACETICO	100	131,3 ± 45,8	146,8 ± 47,1	N/E
	MACHOS SALINO	100	104,8 ± 34,1	110,3 ± 37,5	N/E
IMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	256,0 ± 16,4 *	297,4 ± 15,0 *	N/E
DOXEPINA	HEMBRAS ACETICO	100	136,1 ± 18,1	187,7 ± 20,6	N/E
AMITRIPTILINA	HEMBRAS ACETICO	100	123,8 ± 2,1	N/E	N/E
DULOXETINA	HEMBRAS ACETICO	100	493,9 ± 23,8 *	924,2 ± 35,2 *	N/E
	HEMBRAS SALINO	100	153,9 ± 71,1	250,3 ± 84,0 *	N/E
	MACHOS ACETICO	100	257,2 ± 33,6 *	400,4 ± 44,1 *	N/E
	MACHOS SALINO	100	144,7 ± 50,8	166,9 ± 65,0	N/E
MILNACIPRAN	HEMBRAS ACETICO	100	113,0 ± 13,2	137,0 ± 23,4	N/E
BESIPIRDINA	HEMBRAS ACETICO	100	977,5 ± 75,3 *	1155,3 ± 51,5 *	1021,2 ± 49,3 *
HP-748	HEMBRAS ACETICO	100	387,5 ± 23,7 *	449,7 ± 53,4 *	503,5 ± 64,8 *
OXIBUTININA	HEMBRAS ACETICO	100	86,1 ± 18,1	87,7 ± 20,6	83,7 ± 22,9
PLACEBO	HEMBRAS ACETICO	100	90,4 ± 46,8	93,0 ± 23,2	N/E

N/E: No Estudiado. \* Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al placebo (Wilcoxon rank test).

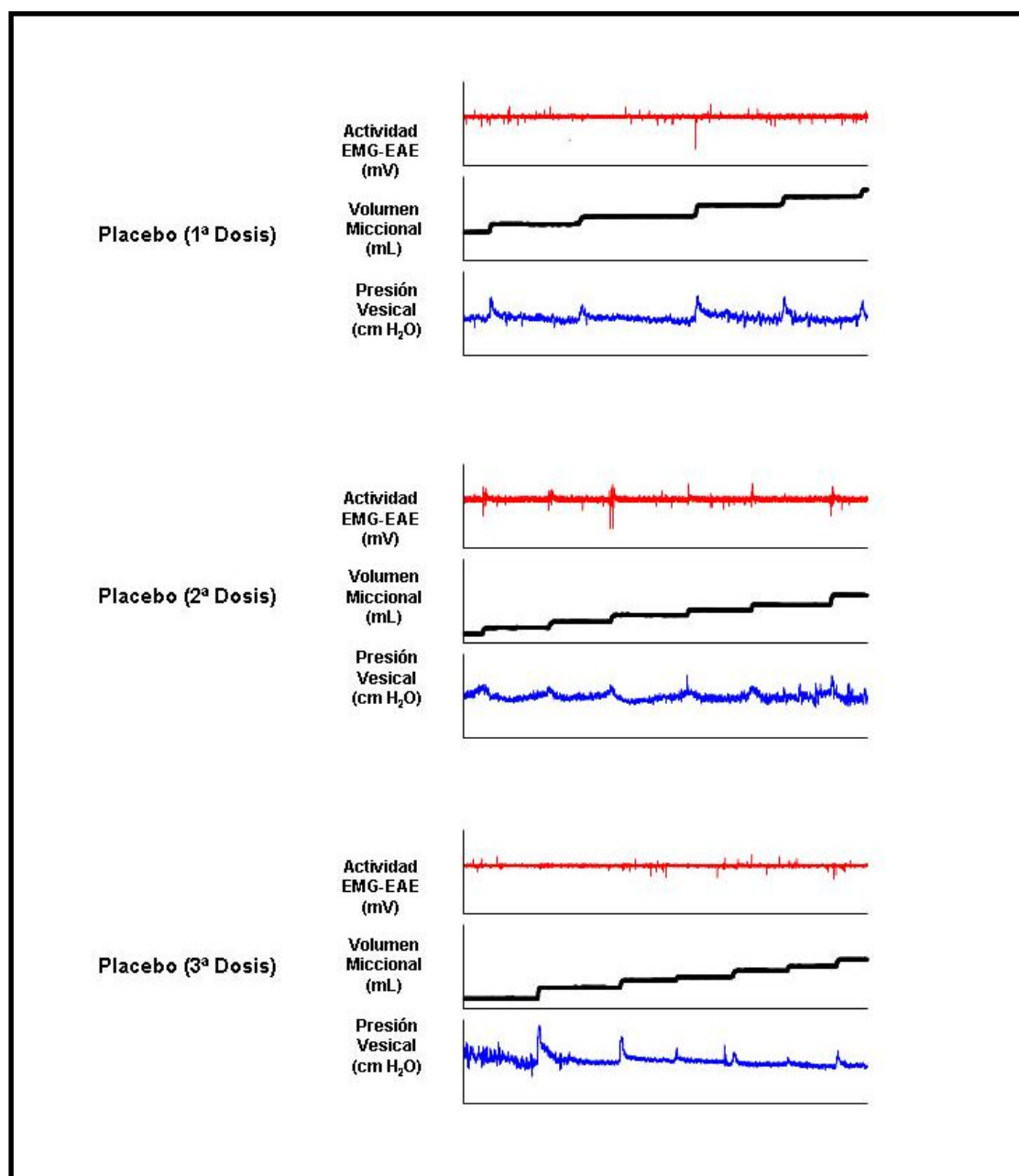


Figura 24. Ejemplo representativo de los estudios en conejos hembra mostrando que la administración repetida de suero salino (placebo) no produce cambios sobre la Presión Vesical (cm H<sub>2</sub>O), el Volumen Miccional (mL) y la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) durante la infusión intravesical de ácido acético al 0,5%. Los vértices verticales representan 40 cm H<sub>2</sub>O (para la Presión Vesical), 60 mL (para el Volumen Miccional) o 1 (0 ± 0,5) mV (para la actividad EMG-EAE). Todos los ejes horizontales representan un tiempo de 20 min.

### **4.3 ESTUDIO DE IMIPRAMINA**

Imipramina se estudió a dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

En hembras, la imipramina parece tener un efecto marcado sobre algunos parámetros cistométricos, hecho que confirma estudios previos sobre este fármaco (Fig. 25). Podemos ver que la imipramina produce un incremento dosis-dependiente significativo de la CV, la DM, el VM y el IEM, y una reducción de la PV. Sobre la actividad EMG-EAE, imipramina también incrementó de forma dosis-dependiente este parámetro electromiográfico. La imipramina parece no tener ningún efecto sobre la AM en el grupo de conejos hembra estudiado bajo condiciones de irritabilidad vesical.

### **4.4 ESTUDIO DE DOXEPINA**

Doxepina se estudió a dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

En este grupo de animales, doxepina incremento de forma dosis-dependiente el IEM y redujo de igual manera la PV. Además, tras la administración de la segunda dosis de doxepina se produjo un incremento de la CV y la DM, sin cambios en el resto de parámetros cistométricos y en la actividad EMG-EAE. Sin duda, al contrario de lo que muestran algunos estudios *in vitro*, parece que es un fármaco poco útil para el tratamiento de la IU de esfuerzo, si lo comparamos con otros ATs como imipramina o clomipramina.

Tabla II. Capacidad Vesical y Volumen Miccional.

		PARÁMETROS CISTOMÉTRICOS									
		CAPACIDAD VESICAL (CV)					VOLUMEN MICCIONAL (VM)				
		Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)	Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)		
CLOMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	134,4 ± 9,4 *	161,6 ± 11,6 *	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
	HEMBRAS SALINO	100	104,8 ± 11,9	108,4 ± 12,2	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
	MACHOS ACETICO	100	110,9 ± 8,1	123,4 ± 5,6 *	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
	MACHOS SALINO	100	103,6 ± 7,8	107,2 ± 8,6	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
IMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	125,8 ± 17,9 *	143,1 ± 16,3 *	N/E	100	154,8 ± 13,6 *	172,8 ± 26,3 *			N/E
DOXEPINA	HEMBRAS ACETICO	100	116,9 ± 5,4	139,4 ± 23,8 *	N/E	100	116,6 ± 30,9	126,4 ± 31,7			N/E
AMITRIPTILINA	HEMBRAS ACETICO	100	123,3 ± 0,6 *	N/E	N/E	100	102,7 ± 1,6	N/E			N/E
	HEMBRAS ACETICO	100	158,0 ± 13,6 *	183,6 ± 16,5 *	N/E	100	186,9 ± 34,2 *	221,8 ± 45,3 *			N/E
DULOXETINA	HEMBRAS SALINO	100	105,9 ± 29,4	111,5 ± 29,5	N/E	N/E	N/E	N/E			N/E
	MACHOS ACETICO	100	127,4 ± 13,7 *	143,6 ± 17,8 *	N/E	N/E	N/E	N/E			N/E
	MACHOS SALINO	100	105,2 ± 8,3	108,0 ± 8,5	N/E	N/E	N/E	N/E			N/E
	HEMBRAS ACETICO	100	129,1 ± 14,9 *	144,6 ± 19,1 *	N/E	100	103,0 ± 22,4	137,2 ± 16			N/E
MILNACIPRAN	HEMBRAS ACETICO	100	200,9 ± 25,9 *	263,0 ± 31,0 *	313,3 ± 33,9 *	100	176,3 ± 33,9 *	273,6 ± 57,7 *			293,3 ± 63,6 *
BESIPIRDINA	HEMBRAS ACETICO	100	122,1 ± 12,0 *	142,8 ± 14,7 *	175,4 ± 13,7 *	100	113,6 ± 21,5	121,0 ± 23,0			134,8 ± 25,5
HP-748	HEMBRAS ACETICO	100	184,2 ± 11,7 *	250,9 ± 22,1 *	345,6 ± 35,4 *	100	210,7 ± 80,1 *	299,2 ± 50,7 *			477,6 ± 13,9 *
OXIBUTININA	HEMBRAS ACETICO	100	103 ± 15,8	107,2 ± 26,7	N/E	100	99,8 ± 19,9	88,5 ± 25,5			N/E
PLACEBO	HEMBRAS ACETICO	100				100					

N/E: No Estudiado. \* Estadísticamente significativo (p&lt; 0,05) con respecto al placebo (Wilcoxon rank test).

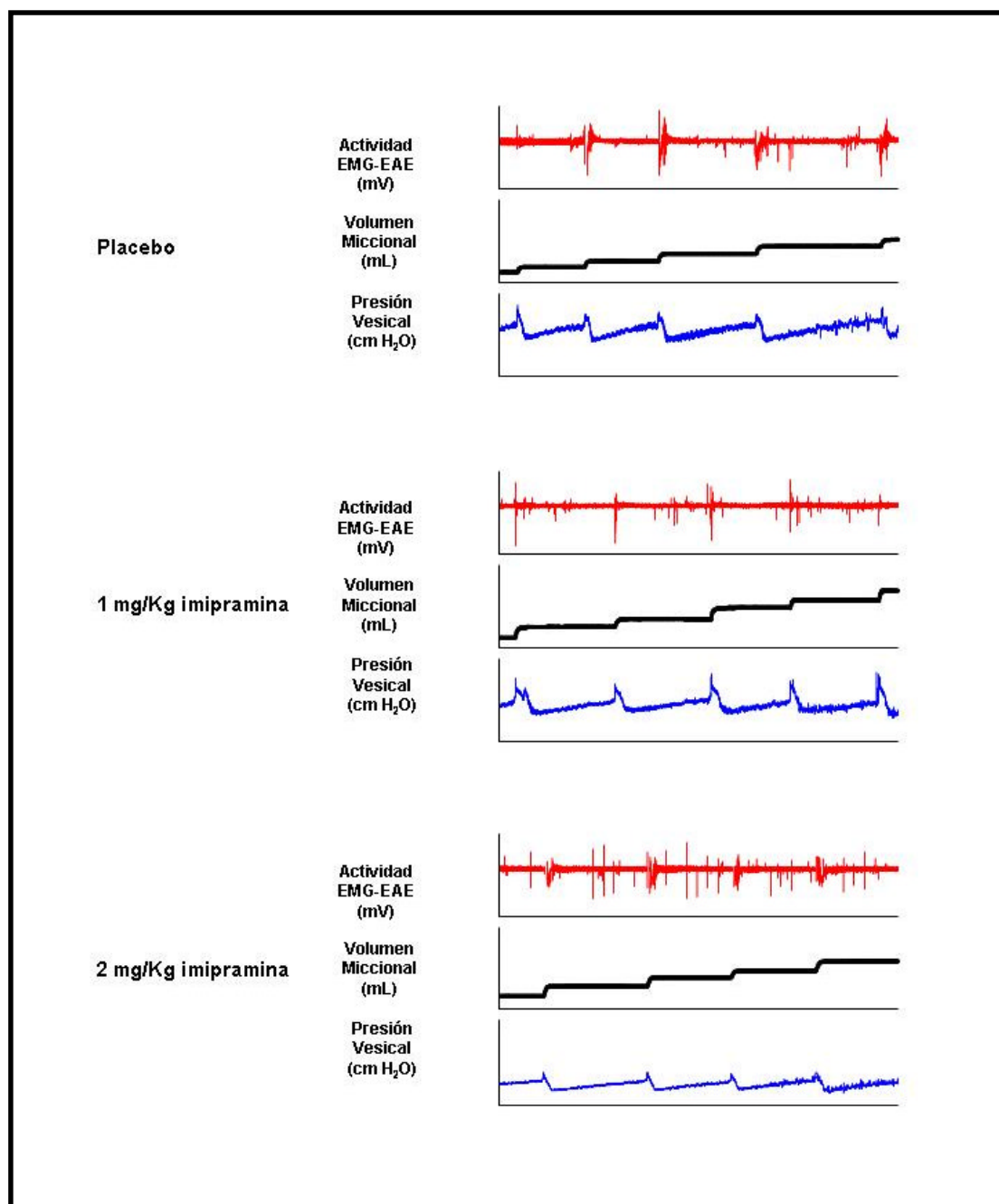


Figura 25. Ejemplo representativo de los estudios en conejos hembra mostrando los efectos dosis-dependiente de Imipramina sobre la Presión Vesical (cm H<sub>2</sub>O), el Volumen Miccional (mL) y la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) durante la infusión intravesical de ácido acético al 0,5%. Los vértices verticales representan 40 cm H<sub>2</sub>O (para la Presión Vesical), 60 mL (para el Volumen Miccional) o 1 (0 ± 0,5) mV (para la actividad EMG-EAE). Todos los ejes horizontales representan un tiempo de 20 min.

#### **4.5 ESTUDIO DE AMITRIPTILINA**

Amitriptilina se estudió a una única dosis de 1 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

Primero es importante destacar que la administración de la segunda dosis de amitriptilina (2 mg/Kg) produjo la muerte de varios animales (n=2), por lo que en este estudio, sólo se ha investigado el efecto de la administración IV de 1 mg/Kg de amitriptilina. En los animales estudiados, la administración de amitriptilina sólo incrementó significativamente la CV y disminuyó la PV. Por otro lado, no se vieron efectos significativos en el resto de parámetros cistométricos estudiados. 1 mg/Kg de amitriptilina tampoco aumentó la actividad EMG-EAE significativamente.

#### **4.6 ESTUDIO DE DULOXETINA**

Duloxetina se estudió a dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg en conejos machos y hembra bajo infusión intravesical de suero salino o de ácido acético al 0,5%.

En condiciones de irritabilidad en conejos machos y hembras, duloxetina incrementó de forma dosis-dependiente la CV, la DM, el IEM y la actividad EMG-EAE. Por otro lado, duloxetina no causó cambios en la PV y en la AM en ninguno de los grupos donde se ha estudiado.

En condiciones de “normalidad”, el único efecto que se observó tras la administración de duloxetina, fue un aumento de la actividad EMG-EAE sólo tras la administración de 2mg/Kg de duloxetina en conejos hembras, aunque en los casos donde la actividad EMG-EAE no cambió significativamente, se pudo ver una tendencia a incrementarse, pero que no llegaba a ser significativa.

Otro parámetro cistométrico como el VM sólo fue medido en el estudio del efecto de duloxetina en conejos hembras bajo condiciones de irritación vesical (Fig. 26). De este modo, duloxetina incrementó de forma dosis-dependiente el VM en este grupo de animales.

#### **4.7 ESTUDIO DE MILNACIPRAN**

Milnacipran se estudió a dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

La administración IV de milnacipran produjo un incremento de forma dosis-dependiente en la CV y en el IEM. Sin embargo, la administración de milnacipran no produjo un incremento significativo de la actividad EMG-EAE y del resto de parámetros cistométricos en condiciones de irritación vesical.

Tabla III. Duración de la Contracción Miccional e Intervalo Entre Contracciones Miccionales.

		PARÁMETROS CISTOMÉTRICOS									
		DURACIÓN DE LA CONTRACCIÓN MICCIONAL (DM)					INTERVALO ENTRE CONTRACCIONES MICCIONALES (IEM)				
		Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)	Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)		
CLOMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	113,2 ± 4,8 *	121,3 ± 31,1 *	N/E	100	132,1 ± 14,3 *	163,4 ± 12,8 *	N/E		
	HEMBRAS SALINO	100	101,5 ± 24,7	100,8 ± 24,5	N/E	100	114,6 ± 7,6	119,2 ± 8,6	N/E		
	MACHOS ACETICO	100	110,0 ± 27,7	128,1 ± 27,8 *	N/E	100	119,1 ± 6,9	139,7 ± 9,1 *	N/E		
	MACHOS SALINO	100	105,9 ± 16,8	104,4 ± 18,9	N/E	100	118,3 ± 14,7	124,2 ± 24,8	N/E		
IMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	100	117,6 ± 19,1 *	127,9 ± 17,9 *	N/E	100	141,4 ± 5,5 *	160,0 ± 18,2 *	N/E		
DOXEPINA	HEMBRAS ACETICO	100	111,0 ± 20,2	122,1 ± 15,6 *	N/E	100	148,9 ± 57,1 *	164,5 ± 48,9 *	N/E		
AMITRIPTILINA	HEMBRAS ACETICO	100	103,5 ± 4,2	N/E	N/E	100	90,1 ± 2,2	N/E	N/E		
DULOXETINA	HEMBRAS ACETICO	100	131,8 ± 13,6 *	164,4 ± 12,6 *	N/E	100	176,0 ± 19,2 *	210,0 ± 22,3 *	N/E		
	HEMBRAS SALINO	100	108,9 ± 9,6	107,8 ± 8,7	N/E	100	118,3 ± 13,8	117,3 ± 14,7	N/E		
	MACHOS ACETICO	100	118,7 ± 10,6 *	150,0 ± 9,3 *	N/E	100	130,5 ± 9,1 *	169,8 ± 9,4 *	N/E		
	MACHOS SALINO	100	104,2 ± 20,8	100,2 ± 13,5	N/E	100	116,1 ± 7,4	115,8 ± 7,3	N/E		
MILNACIPRAN	HEMBRAS ACETICO	100	115,4 ± 15,2	117,5 ± 16,3	N/E	100	144,8 ± 12,9 *	145,5 ± 13,2 *	N/E		
BESIPIRDINA	HEMBRAS ACETICO	100	116,4 ± 10,6	162,4 ± 10,5 *	176,0 ± 11,2 *	100	244,5 ± 35,4 *	232,8 ± 21,4 *	370,8 ± 33,4 *		
HP-748	HEMBRAS ACETICO	100	112,6 ± 5,1	135,2 ± 5,6 *	154,9 ± 7,8 *	100	152,7 ± 32,8 *	146,7 ± 24,8 *	205,8 ± 21,7 *		
OXIBUTININA	HEMBRAS ACETICO	100	149,5 ± 24,6 *	139,0 ± 22,1 *	164,2 ± 19,4 *	100	177,4 ± 38,1 *	301,4 ± 48,3 *	451,9 ± 13,1 *		
PLACEBO	HEMBRAS ACETICO	100	106,3 ± 16,7	131,5 ± 31,9	N/E	100	100,4 ± 20,9	93,6 ± 30,3	N/E		

N/E: No Estudiado. \* Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al placebo (Wilcoxon rank test).



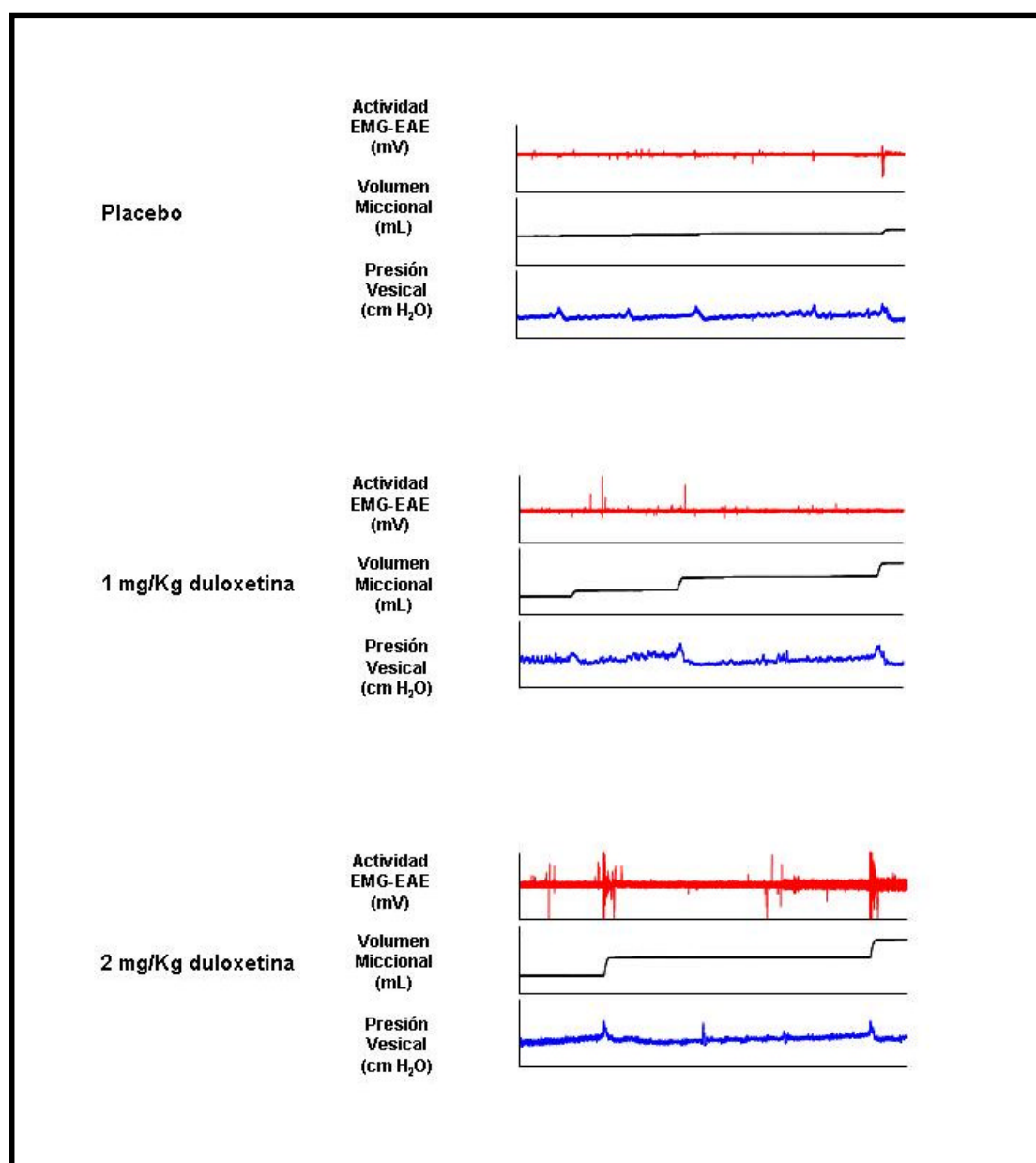


Figura 26. Ejemplo representativo de los estudios en conejos hembra mostrando los efectos dosis-dependiente de Duloxetina sobre la Presión Vesical (cm H<sub>2</sub>O), el Volumen Miccional (mL) y la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) durante la infusión intravesical de ácido acético al 0,5%. Los vértices verticales representan 40 cm H<sub>2</sub>O (para la Presión Vesical), 60 mL (para el Volumen Miccional) o 1 (0 ± 0,5) mV (para la actividad EMG-EAE). Todos los ejes horizontales representan un tiempo de 20 min.

#### **4.8 ESTUDIO DE OXIBUTININA**

Oxibutinina se estudió a dosis progresivas de 0,1, 0,2 y 0,3 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

Los resultados con oxibutinina muestran un potente efecto de este fármaco promoviendo el almacenamiento de orina, ya que incrementa de forma dosis-dependiente la CV, el VM, la DM y el IEM. Además, también redujo la PV y la AM de forma dosis-dependiente.

Sobre la actividad EMG-EAE, oxibutinina no produjo ningún cambio, por lo que parece tener efecto directo sobre la vejiga, pero no incrementa la resistencia uretral a la salida de orina.

#### **4.9 ESTUDIO DE BESIPIRDINA**

Besipirdina se estudió a dosis progresivas de 1, 3 y 5 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

En este grupo de animales, besipirdina incrementó de forma dosis-dependiente la actividad EMG-EAE, la CV, el VM y el IEM (Fig. 27). Sobre la actividad EMG-EAE, el mayor efecto se vio tras la administración de 3 mg/Kg de besipirdina, aunque tras 5 mg/kg este parámetro fue mayor que tras 1 mg/Kg y a su vez que tras la administración del placebo. Además, besipirdina incrementó la DM tras la administración de la segunda y la tercera dosis (3 y 5 mg/Kg). Besipirdina no tuvo ningún efecto sobre la PV y la AM.

Tabla IV. Presión Vesical y Amplitud de la Contracción Miccional.

		PARÁMETROS CISTOMÉTRICOS									
		PRESIÓN VESICAL (PV)					AMPLITUD DE LA CONTRACCIÓN MICCIONAL (AM)				
		Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)	Placebo (%)	1ª Dosis (%)	2ª Dosis (%)	3ª Dosis (%)		
CLOMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)2,5 ± 1,0 *	(-)4,9 ± 1,3 *	N/E	100	101,2 ± 26,4	110,2 ± 27,2	N/E		N/E
	HEMBRAS SALINO	0	0,2 ± 0,6	(-)0,5 ± 0,9	N/E	100	96,0 ± 27,3	93,4 ± 21,4	N/E		N/E
	MACHOS ACETICO	0	(-)1,8 ± 1,7	(-)4,4 ± 1,6 *	N/E	100	101,0 ± 29,9	111,6 ± 29,5	N/E		N/E
	MACHOS SALINO	0	(-)1,1 ± 0,5	(-)1,2 ± 0,7	N/E	100	103,0 ± 21,5	89,1 ± 29,3	N/E		N/E
IMIPRAMINA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)5,6 ± 4,2 *	(-)5,2 ± 4,4 *	N/E	100	97,5 ± 18,2	88,4 ± 21,6	N/E		N/E
DOXEPINA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)6,9 ± 3,1 *	(-)11,1 ± 6,3 *	N/E	100	122,6 ± 21,1	104,2 ± 9,9	N/E		N/E
AMITRIPTILINA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)5,7 ± 3,1 *	N/E	N/E	100	103,1 ± 7,8	N/E	N/E		N/E
DULOXETINA	HEMBRAS ACETICO	0	0,4 ± 0,6	0,3 ± 0,6	N/E	100	109,3 ± 26,5	117,7 ± 26,3	N/E		N/E
	HEMBRAS SALINO	0	1,5 ± 1,7	1,4 ± 1,8	N/E	100	104,0 ± 18,7	92,0 ± 14,4	N/E		N/E
	MACHOS ACETICO	0	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,5	N/E	100	100,3 ± 28,6	108,0 ± 28,5	N/E		N/E
	MACHOS SALINO	0	1,2 ± 1,0	0,9 ± 1,3	N/E	100	114,0 ± 35,4	110,6 ± 30,3	N/E		N/E
MILNACIPRAN	HEMBRAS ACETICO	0	(-)1,6 ± 6,7	1,3 ± 6,3	N/E	100	112,7 ± 17,2	102,7 ± 13,4	N/E		N/E
BESIPIRDINA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)0,2 ± 0,2	(-)0,2 ± 0,3	(-)0,3 ± 0,4	100	127,0 ± 35,7	134,6 ± 34,8	117,4 ± 29,4		
HP-748	HEMBRAS ACETICO	0	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,6	(-)0,2 ± 0,9	100	111,9 ± 15,8	119,1 ± 14,7	117,4 ± 16,3		
OXIBUTININA	HEMBRAS ACETICO	0	(-)12,8 ± 0,9 *	(-)15,2 ± 0,3 *	(-)18,7 ± 0,5 *	100	82,8 ± 11,6 *	75,2 ± 12,8 *	67,0 ± 14,3 *		
PLACEBO	HEMBRAS ACETICO	0	(-)1,5 ± 1,1	(-)1,9 ± 1,2	N/E	100	107,0 ± 31,8	103,1 ± 50,3	N/E		

N/E: No Estudiado. \* Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al placebo (Wilcoxon rank test).

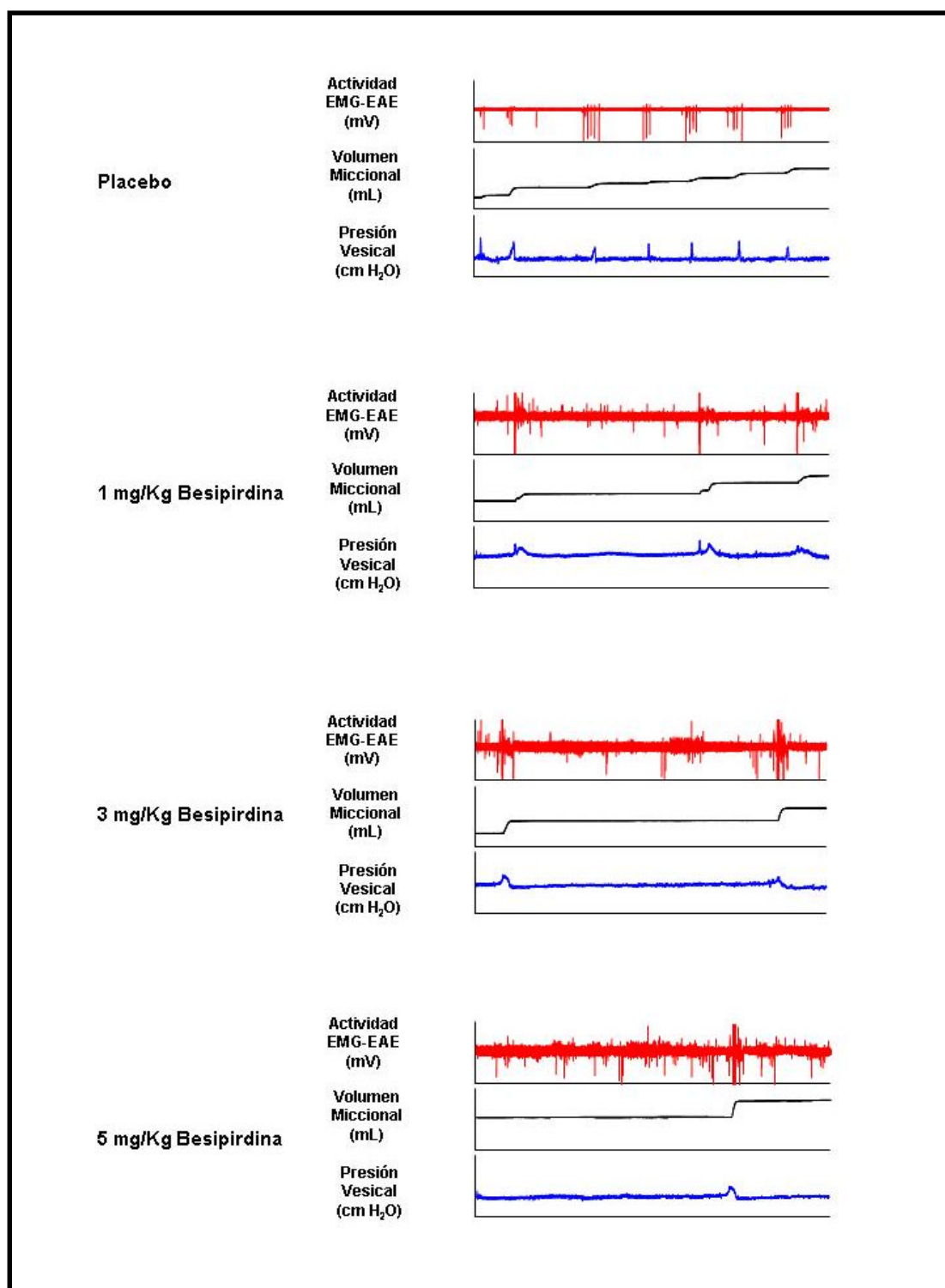


Figura 27. Ejemplo representativo de los estudios en conejos hembra mostrando los efectos dosis-dependiente de Besipirdina sobre la Presión Vesical (cm H<sub>2</sub>O), el Volumen Miccional (mL) y la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) durante la infusión intravesical de ácido acético al 0,5%. Los vértices verticales representan 40 cm H<sub>2</sub>O (para la Presión Vesical), 60 mL (para el Volumen Miccional) o 1 (0 ± 0,5) mV (para la actividad EMG-EAE). Todos los ejes horizontales representan un tiempo de 20 min.

#### **4.10 ESTUDIO DEL METBOLITO HP-748 DE BESIPIRDINA**

El metabolito HP-748 se estudió a dosis progresivas de 0,3, 1 y 3 mg/Kg en conejos hembra bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%.

En estas condiciones, HP-748 produjo un incremento significativo dosis-dependiente en la CV, el IEM y la actividad EMG-EAE. Además, se observó un incremento de la DM al administrar 1 y 3 mg/Kg de HP-748.

## **V. DISCUSIÓN**

## **5.1 IMPORTANCIA DEL NÚCLEO DE ONUF EN EL CONTROL NERVIOSO DEL TRACTO URINARIO INFERIOR**

Seguramente, la compleja red de interconexiones dendríticas que tienen lugar a partir del **núcleo de Onuf**, son el sustrato neuroanatómico de la necesaria integración neural exigida para la continencia en circunstancias de reposo (bajas presiones), a mayores niveles de distensión vesical (altas presiones) y durante la micción coordinada y sinérgica.

En el **esquema tradicional de la micción** (8), se postula que todos los elementos musculares lisos que participan en la dinámica miccional tienen una doble innervación vegetativa, simpática y parasimpática, pero con distribución cuantitativamente diferente, de tal modo que la innervación parasimpática domina en el área del detrusor, y la simpática en el área uretral y esfinteriana. La micción estaría protagonizada por la acción del sistema nervioso parasimpático, con descarga de Ach que actuaría activando los numerosos receptores muscarínicos localizados en el detrusor. Estos impulsos serían transmitidos por el **nervio pélvico**, cuyas motoneuronas estarían localizadas en el asta anterolateral de la médula espinal a nivel S2-S4 (núcleo de Onuf). Por otro lado, la continencia estaría protagonizada por el sistema nervioso simpático toracolumbar, a través del **nervio hipogástrico**, cuyo estímulo liberaría NE que actuaría 1) sobre receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos del cuello de la vejiga y de la uretra proximal, produciendo su contracción e incrementando así la resistencia al vaciado, y 2) sobre los  $\beta$ -adrenorreceptores del detrusor, facilitando la relajación del mismo.

Por otro lado, las **nuevas aportaciones a la dinámica miccional** realzan la existencia de actividades detrusorianas no neurogénicas (12), el papel del SNC (13,14) y dan más relevancia al EUE (15). Así, actualmente se concede un protagonismo especial al núcleo de Onuf, un grupo de

motoneuronas altamente sensibles a la actuación de 5-HT y NE. El incremento de estos neurotransmisores en dicha zona motivaría la contracción del EUE (12,21,24,28,29). Además se asume, por investigaciones recientes, que debe haber una actividad NANC especialmente relacionada con receptores purinérgicos, con la 5-HT y con el óxido nítrico (216,217).

Estudios animales han implicado a la 5-HT y a la NE en el control neuronal de la dinámica miccional (53). En un estudio en gatos, agonistas serotoninérgicos inhibieron la actividad parasimpática e incrementaron la actividad simpática y somática, promoviendo el almacenamiento de orina a través de la relajación vesical y del incremento de la resistencia en las vías de salida de orina (52). La NE afecta de forma variable sobre el TUI, dependiendo del subtipo de receptores adrenérgicos sobre el que actúe (49,218).

La manipulación farmacológica del **“bucle gamma”** es difícil, sin embargo, actuar sobre el **núcleo de Onuf**, modulando la recaptación de 5-HT y NE, es más sencilla. En la actualidad, conocemos algunas singularidades propias de este núcleo de Onuf y sus motoneuronas, que permiten su visión en profundidad para intentar modificarlo farmacológicamente. Estas motoneuronas tienen en sus terminales concentraciones muy elevadas de aminoácidos, neuropéptidos y monoaminas (NE, 5-HT y dopamina), y a su vez poseen altas concentraciones de receptores relacionados con estos neurotransmisores. Esta singular neuroanatomía química, permite manipulaciones farmacológicas a nivel de la hendidura sináptica, especialmente para conseguir la potenciación del tono y la actividad del EUE, más que para inhibir la hiperactividad esfinteriana en circunstancias patológicas. El fundamento de esta estrategia se basa en que la potenciación de la actividad del esfínter estriado se podría conseguir, al menos en teoría, por estimulación de la acción del glutamato mediante la 5-HT, por agonismo  $\alpha$ 1-adrenérgico en el núcleo de Onuf y por agonismo nicotínico en el EUE.



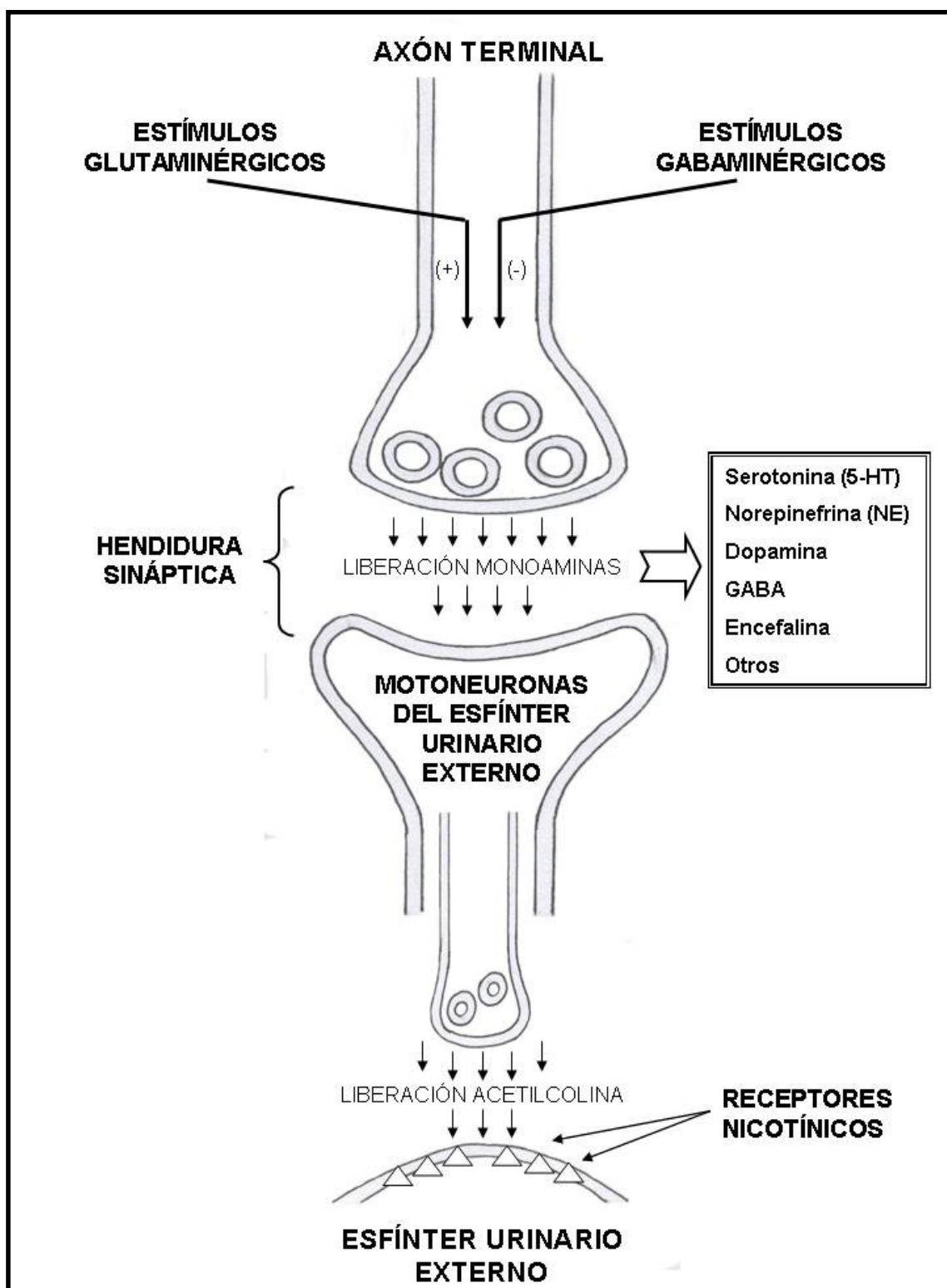


Figura 28. HENDIDURA SINÁPTICA. Comportamiento fisiológico con liberación de monoaminas que ulteriormente estimulan las motoneuronas liberadoras de Acetilcolina.

Cada uno de los mecanismos anteriores, por si solos, podrían conseguir su objetivo, aunque de manera muy parcial. Una manera indirecta de conseguir, a nivel de la hendidura sináptica, una potenciación del efecto serotoninérgico y  $\alpha$ -adrenérgico, sería emplear inhibidores de la recaptación de 5-HT y NA (219), hecho que se consigue precisamente con los ATs, los SNRIs y besipirdina (Figs. 28 y 29).

La aplicación de esta estrategia ha confirmado respuestas tónicas significativas del esfínter estriado en diversas especies animales como en el gato y el conejo (53,220), y ha justificado la investigación y desarrollo de nuevas moléculas para potenciar la continencia urinaria, a través de su efecto sobre el núcleo de Onuf y el EUE.

## **5.2 FARMACOLOGÍA DE LA INCONTINENCIA DE ESFUERZO**

La mayoría de las alternativas terapéuticas farmacológicas clásicas de la IU de esfuerzo, producen un efecto  $\alpha$ -adrenérgico a nivel uretral (151). Por ejemplo, **fenilpropanolamina** produce un incremento en la presión máxima de cierre de la uretra y disminuye el número de episodios de pérdidas de orina (221-224), aunque la aparición de efectos cardiacos adversos ha reducido mucho su utilización (225-227). **Norefedrina**, es otro agonista  $\alpha$ -adrenérgico con el que se ha visto una mejoría de los síntomas de la IU de esfuerzo y un incremento de la presión máxima uretral de cierre (151,228,229).

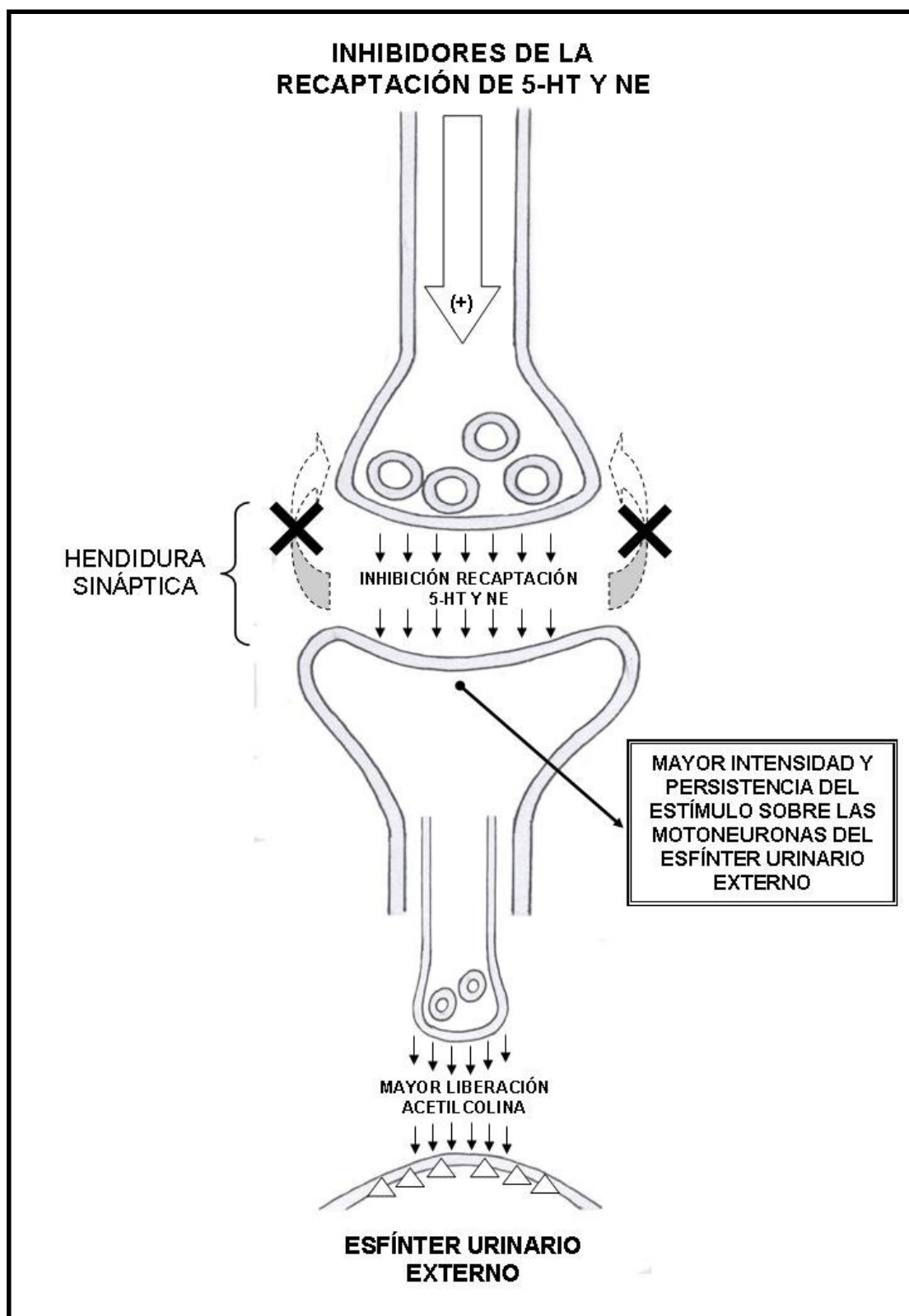


Figura 29. HENDIDURA SINÁPTICA. Efecto de compuestos inhibidores de la recaptación de serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE), potenciando indirectamente la liberación de Acetilcolina por las motoneuronas del Esfínter Urinario Externo.

La búsqueda de nuevos tratamientos de la IU de esfuerzo femenina ha llevado a la identificación y desarrollo de compuestos que poseen varios mecanismos de acción y que actúan sobre varios neurotransmisores distintos. Estos compuestos actúan a nivel de receptores y a nivel intracelular modulando sistemas de segundo mensajero y la excitabilidad neuronal. Por ello, hay un entusiasmo creciente, ante la investigación de nuevas moléculas con efecto inhibidor de la recaptación de 5-HT y NE, entre las que destaca duloxetine. Este último fármaco parece eficaz, mejorando los síntomas de la IU de esfuerzo, por medio de la estimulación de la actividad del EUE, y no parece tener efectos secundarios importantes que limiten su utilización.

### **5.3 ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS**

Estos fármacos poseen acciones farmacológicas reconocidas: 1) tienen efectos a nivel **central** y **periférico**, 2) inhiben la recaptación a nivel presináptico de **5-HT** y **NE**, 3) son **sedantes**, posiblemente por una actividad antihistaminérgica, y 4) tienen efectos **anticolinérgicos** sistémicos, que son más débiles a nivel del TUI (230).

En esta tesis doctoral, la inervación nociceptiva de la vejiga ha sido evaluada usando un modelo de irritación vesical, infundiendo ácido acético diluido en la vejiga (213,215). Con este modelo también se ha evaluado el reflejo vesicoanal, ya que en estudios previos se ha visto que dicho reflejo está mediado por fibras nociceptivas que activan motoneuronas del EAE a través de un mecanismo reflejo espinal (213), al igual que ocurre con el reflejo vesicouretral.

Entre las numerosas acciones de los ATs sobre el SNC y periférico, el bloqueo colinérgico de los receptores muscarínicos post-sinápticos es responsable de la mayoría de los efectos secundarios asociados con el tratamiento con **clomipramina** (231,232). Sin embargo, se sabe que estos

efectos anticolinérgicos a nivel del TUI son menores que los vistos en otros órganos como el corazón (231).

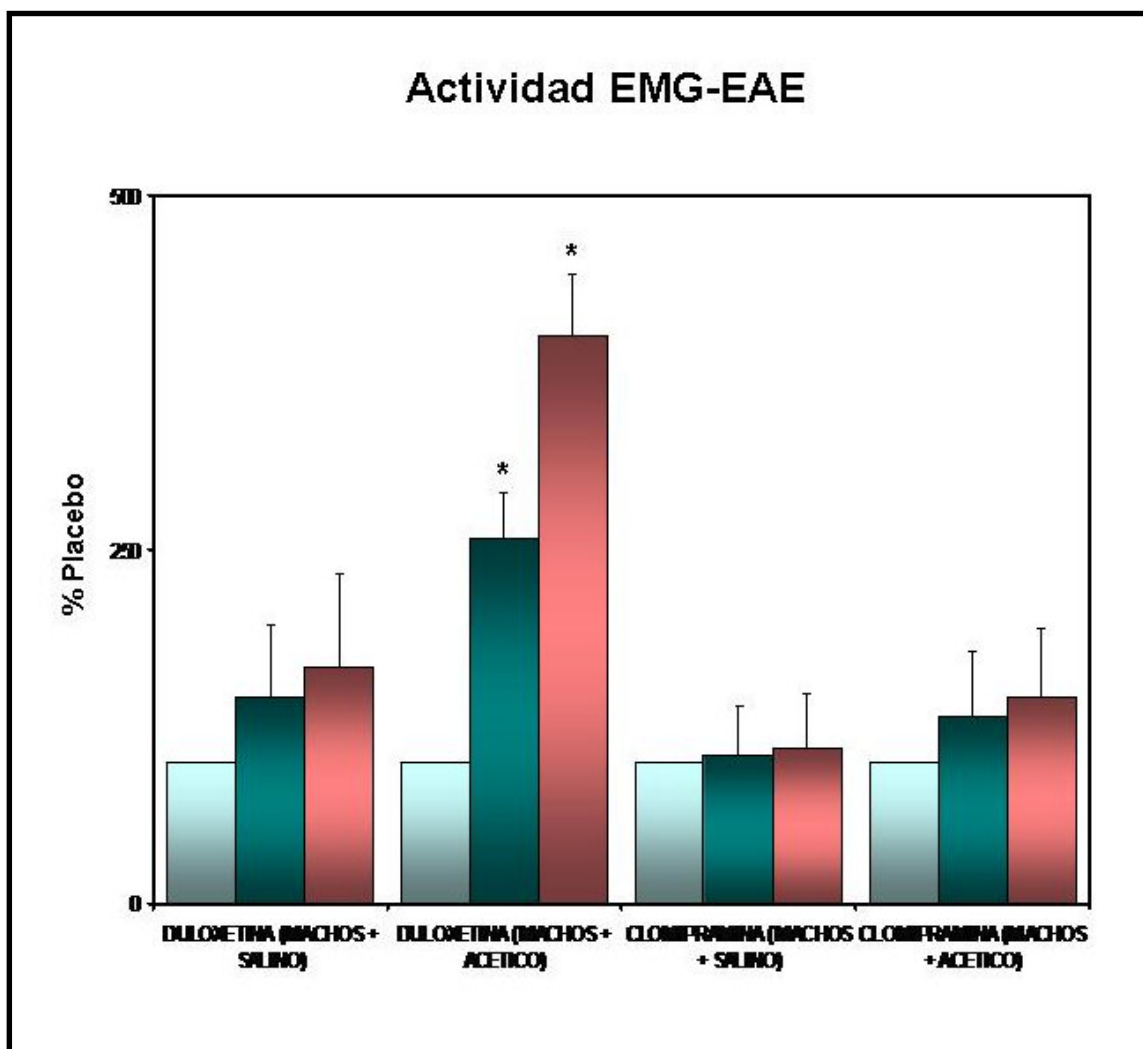


Figura 30. Efectos comparativos sobre la actividad EMG-EAE de Clomipramina y Duloxetina en conejos machos estudiados en condiciones de “normalidad” (infusión intravesical de suero salino) o irritativas (infusión intravesical de ácido acético al 0,5%). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetina. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

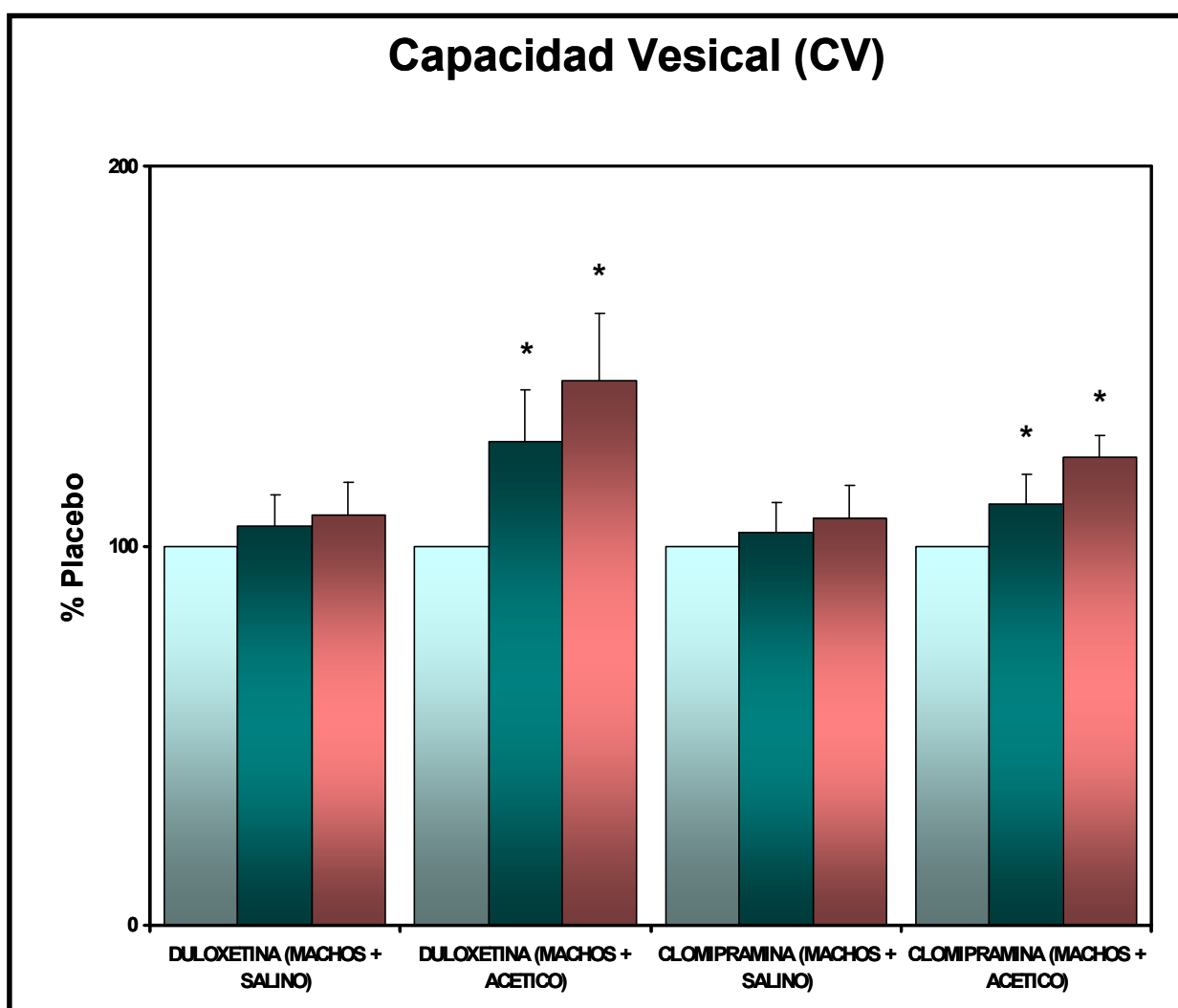


Figura 31. Efectos comparativos sobre la Capacidad Vesical de Clomipramina y Duloxetina en conejos machos estudiados en condiciones de “normalidad” o irritativas. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetina. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

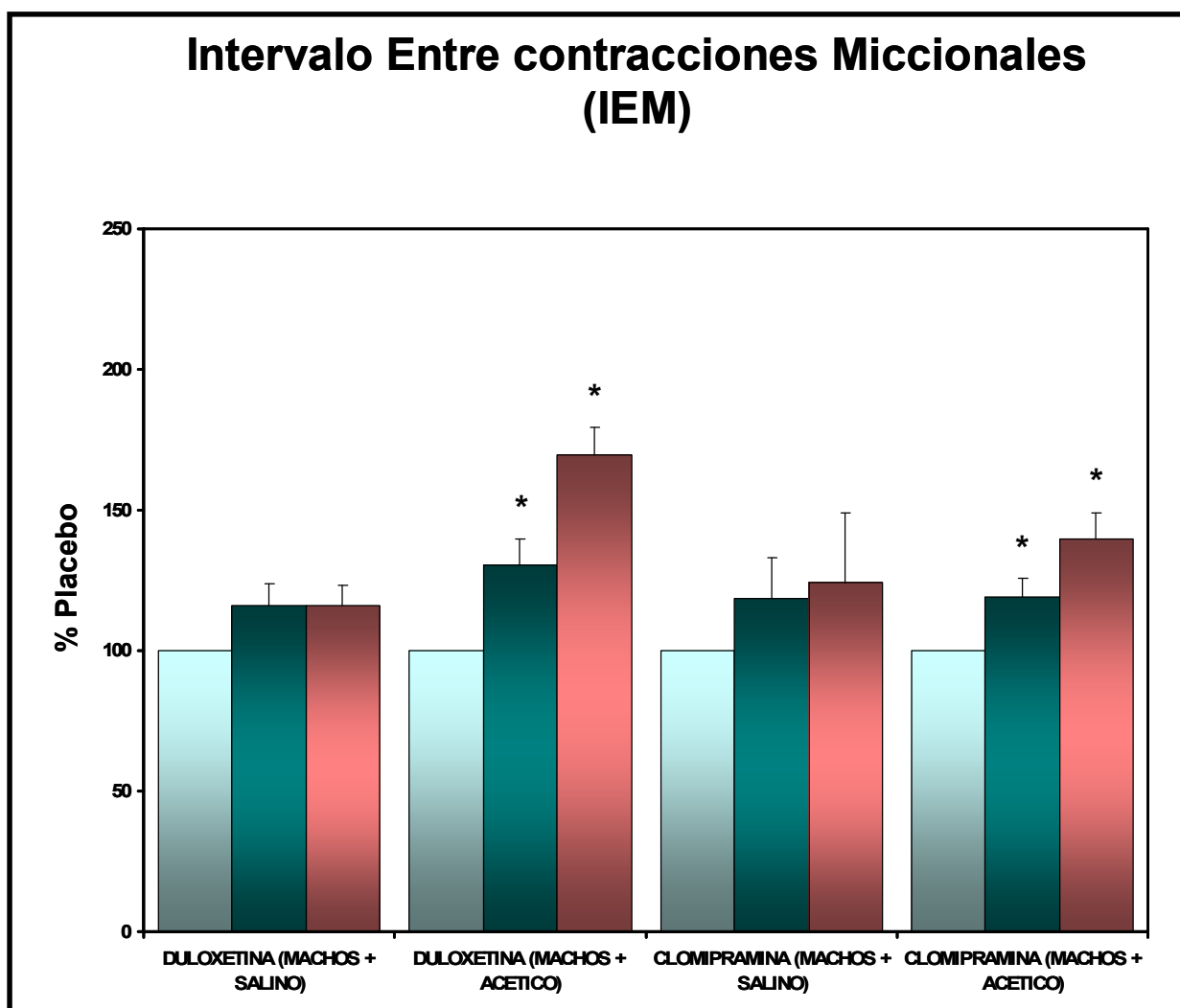


Figura 32. Efectos comparativos sobre el Intervalo Entre contracciones Miccionales (IEM) de Duloxetina y Clomipramina en conejos machos estudiados en condiciones de “normalidad” o irritativas. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetina. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

En estudios con clomipramina, se han encontrado resultados contrapuestos en cuanto a su efecto a nivel del TUI (231-233). En un caso clínico en una gata, se utilizó clomipramina a dosis de 1 mg/Kg, y sólo fueron necesarios dos días para que en el animal se produjera una clara situación de retención urinaria (232). En otro estudio, la administración de clomipramina en pacientes humanos sanos, no provocó ningún efecto de disfunción miccional (231). Sin embargo, se han descrito retenciones urinarias tanto en animales (232) como en humanos (233), tras el tratamiento con clomipramina. Este AT actúa inhibiendo la recaptación de 5-HT y NE, aunque principalmente se caracteriza por inhibir la recaptación de 5-HT a nivel del SNC (160,167).

También hay estudios contradictorios sobre el efecto anticolinérgico de clomipramina en el TUI (231-233). Por un lado, signos de denervación parasimpática en el TUI han sido atribuidos a clomipramina en un estudio de Kristensen E y cols (231) en humanos y en otro trabajo de Pfeiffer E y cols (232) en un gato. Por el contrario, los episodios de retención urinaria en un adolescente, causados por el tratamiento con clomipramina, no respondieron a betanecol (un activador de receptores muscarínicos), ni a fenoxibenzamina (un bloqueante de receptores adrenérgicos) (167,233). En un estudio *in vitro* de Rehavi M y cols (234) en el que se investigó la actividad anticolinérgica de varios ATs, entre los que se encontraban clomipramina y amitriptilina, se mostró que la actividad anticolinérgica de clomipramina a nivel vesical en tejido humano era 7 veces menor que esa actividad a nivel cerebral. Por otro lado, amitriptilina mostró el doble de actividad anticolinérgica a nivel cerebral que en el tejido vesical humano.



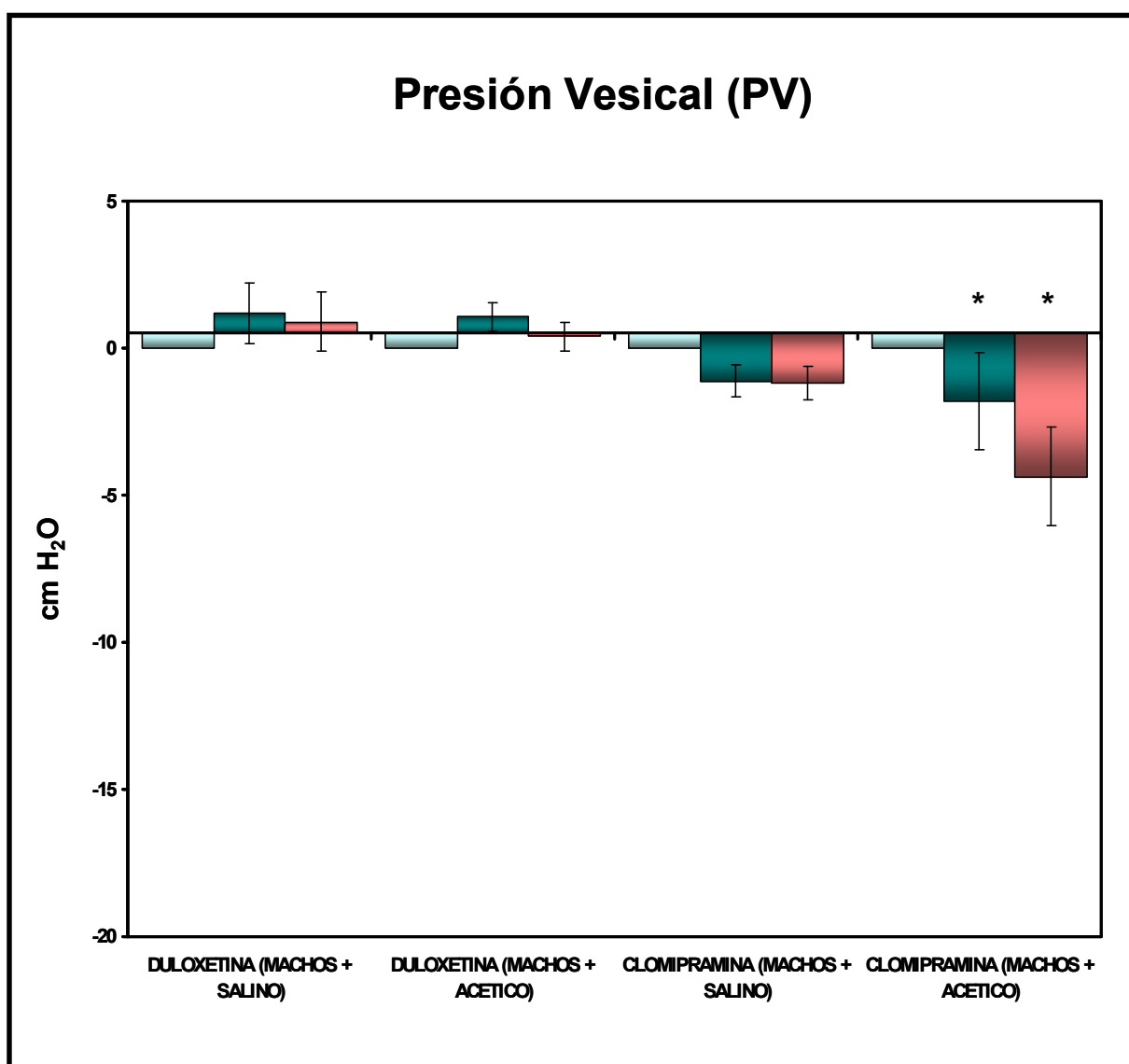


Figura 33. Efectos comparativos sobre la Presión Vesical (PV) de Duloxetina y Clomipramina en conejos machos estudiados en condiciones de “normalidad” o irritativas. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetina. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

Nuestros resultados muestran que la administración de **clomipramina**, en conejos machos y hembras, dio lugar al incremento de la CV, la DM, el IEM y a una disminución significativa de la PV, cuando son estudiados bajo infusión intravesical de ácido acético al 0,5%. Estos cambios indican que se reduce la inestabilidad vesical producida por la irritación vesical con ácido acético diluido. En condiciones no irritativas, infundiendo suero salino en la vejiga, no se produjo un incremento significativo de ninguno de los parámetros cistométricos estudiados. Sobre la actividad EMG-EAE, clomipramina sólo produjo cambios en conejos hembra bajo condiciones de irritación vesical, lo que indica que las vías nociceptivas que se activan al infundir la vejiga con ácido acético, son inhibidas con la administración de clomipramina en conejos hembra, pero no en machos. Los resultados también indican que en condiciones de “normalidad”, cuando estas vías nociceptivas no están activadas, clomipramina no tuvo efectos significativos sobre la actividad EMG-EAE. Esto significa que el efecto de clomipramina se produce a través de una ligera relajación vesical, pero principalmente, por un efecto estimulante de la actividad del esfínter estriado cuando hay irritación vesical y las vías nociceptivas están activadas. En conclusión, en este estudio, hemos mostrado que clomipramina promueve el almacenamiento de orina, probablemente por medio de la inhibición de la recaptación de 5-HT y NE, y por ligeros efectos anticolinérgicos sobre la dinámica miccional.

**Imipramina** es un AT que posee los mecanismos de acción típicos de esta familia de antidepresivos: inhibidor de la recaptación de 5-HT y NE, efectos sedativos y efectos anticolinérgicos. Imipramina comenzó a utilizarse a finales de los años 70 en muy variadas situaciones clínicas, confirmándose en general una disminución de la contractilidad vesical con incremento de la resistencia uretral (165,235-241).

La investigación clínica sobre imipramina es amplia (166,242-252), cabe destacar el trabajo de Castleden CM y cols (243) en el que trataron 10 ancianos con inestabilidad del detrusor con una única dosis de 25 mg/Kg de imipramina al acostarse, incrementando la dosis progresivamente, cada tercer día, hasta conseguir que el paciente fuera continente, hasta que experimentara reacciones adversas o hasta una dosis máxima de 150 mg. Al final, 6 de los pacientes consiguieron mantener la continencia urinaria (60%).

En los resultados obtenidos tras la administración de 1 y 2 mg/Kg de imipramina en conejos hembras bajo condiciones de irritabilidad vesical, vemos que induce cambios relacionados con la retención de orina y la relajación vesical, o sea, incrementa de forma dosis-dependiente la CV, la DM, el VM, el IEM y la actividad EMG-EAE, y disminuye de igual manera la PV, aunque no produce cambios significativos en la AM. Sin embargo, estos resultados nos hacen suponer que la actividad promotora de almacenamiento de orina de imipramina, ya sea por un efecto periférico en el detrusor o por el incremento de la resistencia a la salida de orina por la uretra (estimulando la actividad del rabdoesfínter), es menor que la producida por clomipramina.

Levin RM y cols (253) en un estudio isométrico realizado en 1984, donde se investigaron cinco ATs distintos, vieron que **doxepina** era el AT más potente a nivel del TUI, en relación con su efecto antimuscarínico y relajante muscular. En los últimos años, los nuevos conocimientos sobre la dinámica continencia/micción han incrementado el protagonismo del SNC y del esfínter estriado en algunos tipos de IU, principalmente en la de esfuerzo, por lo que la inhibición de 5-HT y NE es un mecanismo de acción más importante que el efecto anticolinérgico, para solucionar este tipo de IU.

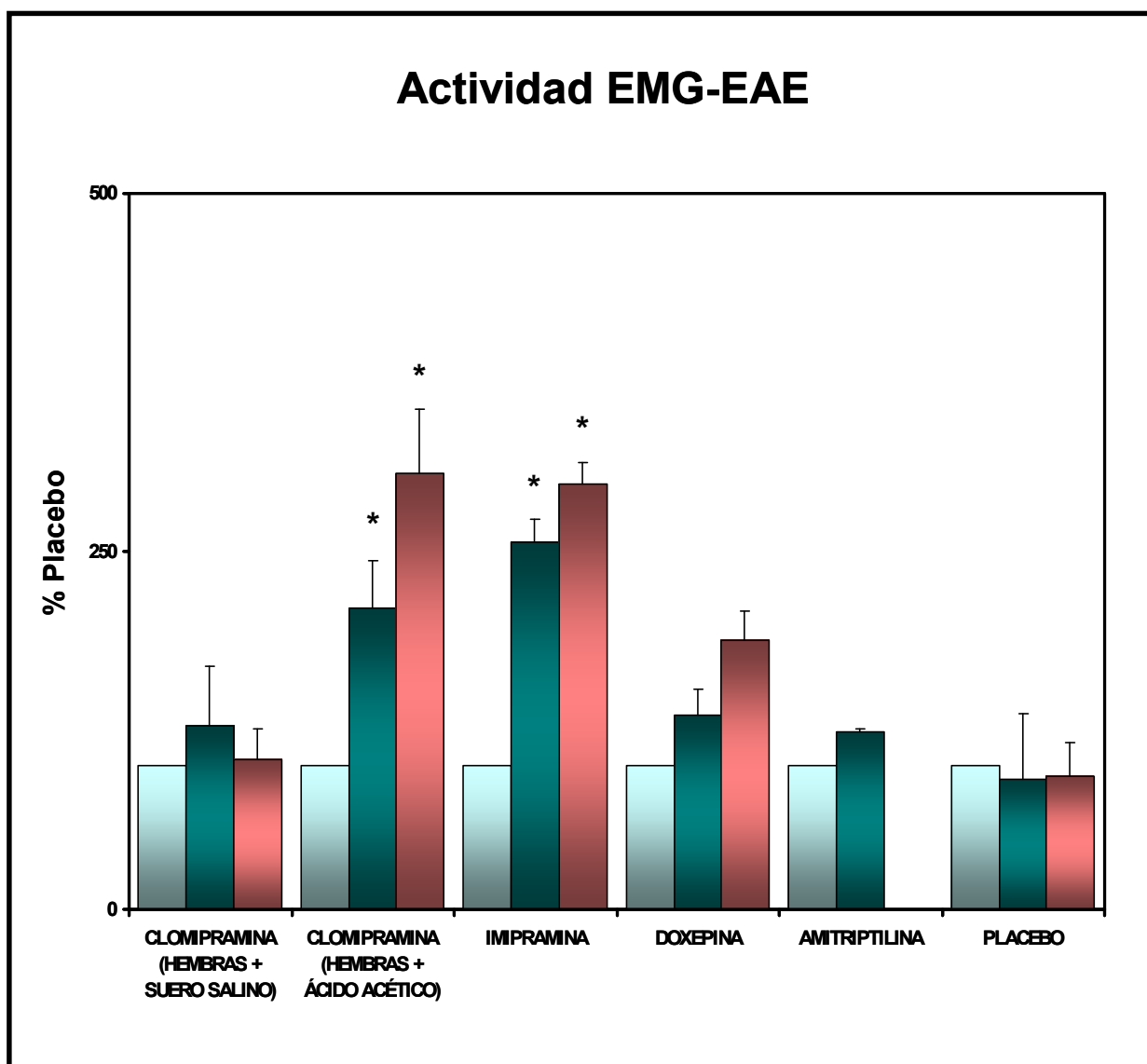


Figura 34. Efectos comparativos sobre la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) de suero salino (placebo) y distintos Antidepresivos Tricíclicos en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Clomipramina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetine. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

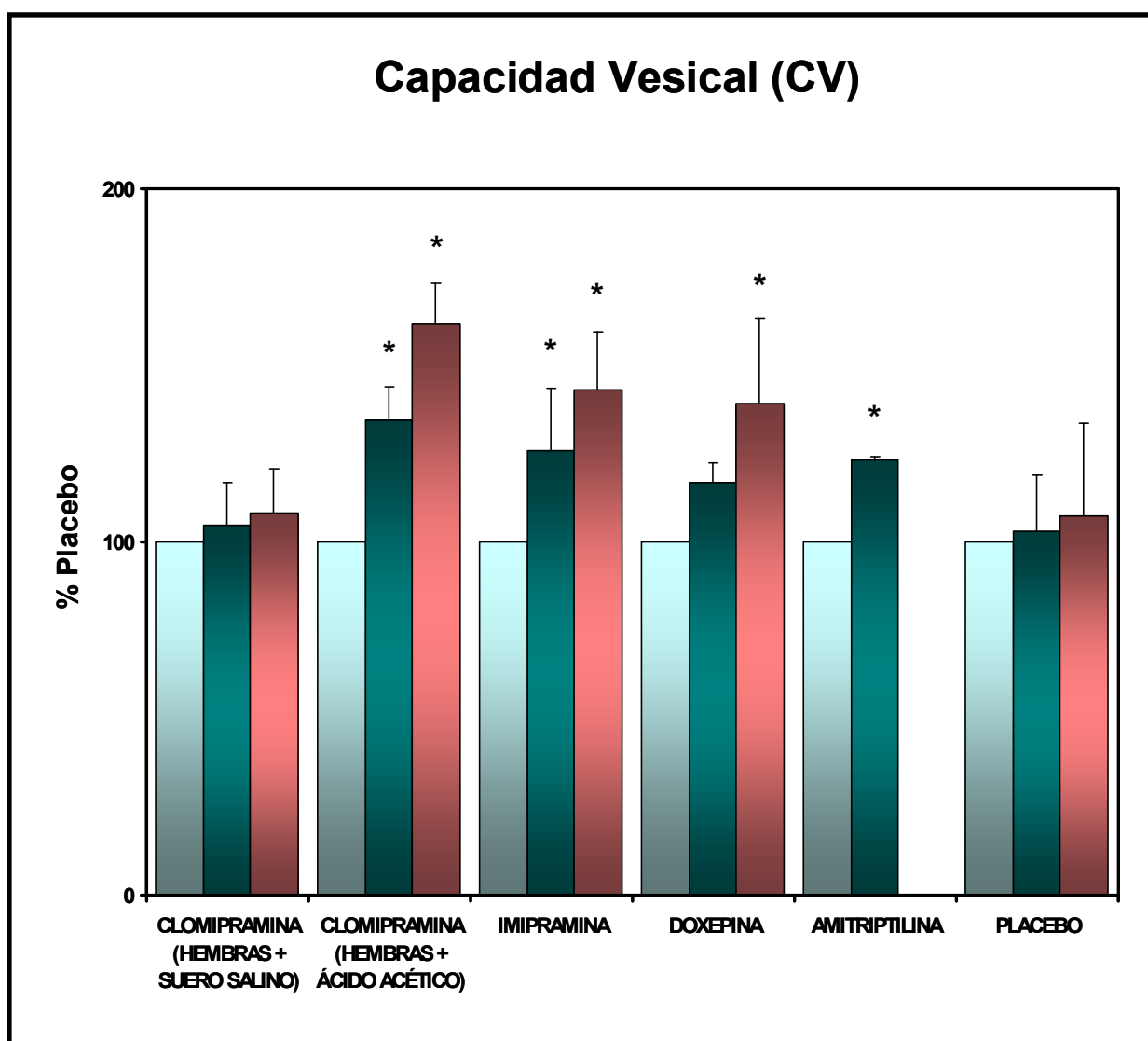


Figura 35. Efectos comparativos sobre la Capacidad Vesical (CV) de suero salino (placebo) y distintos Antidepresivos Tricíclicos en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Clomipramina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetine. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

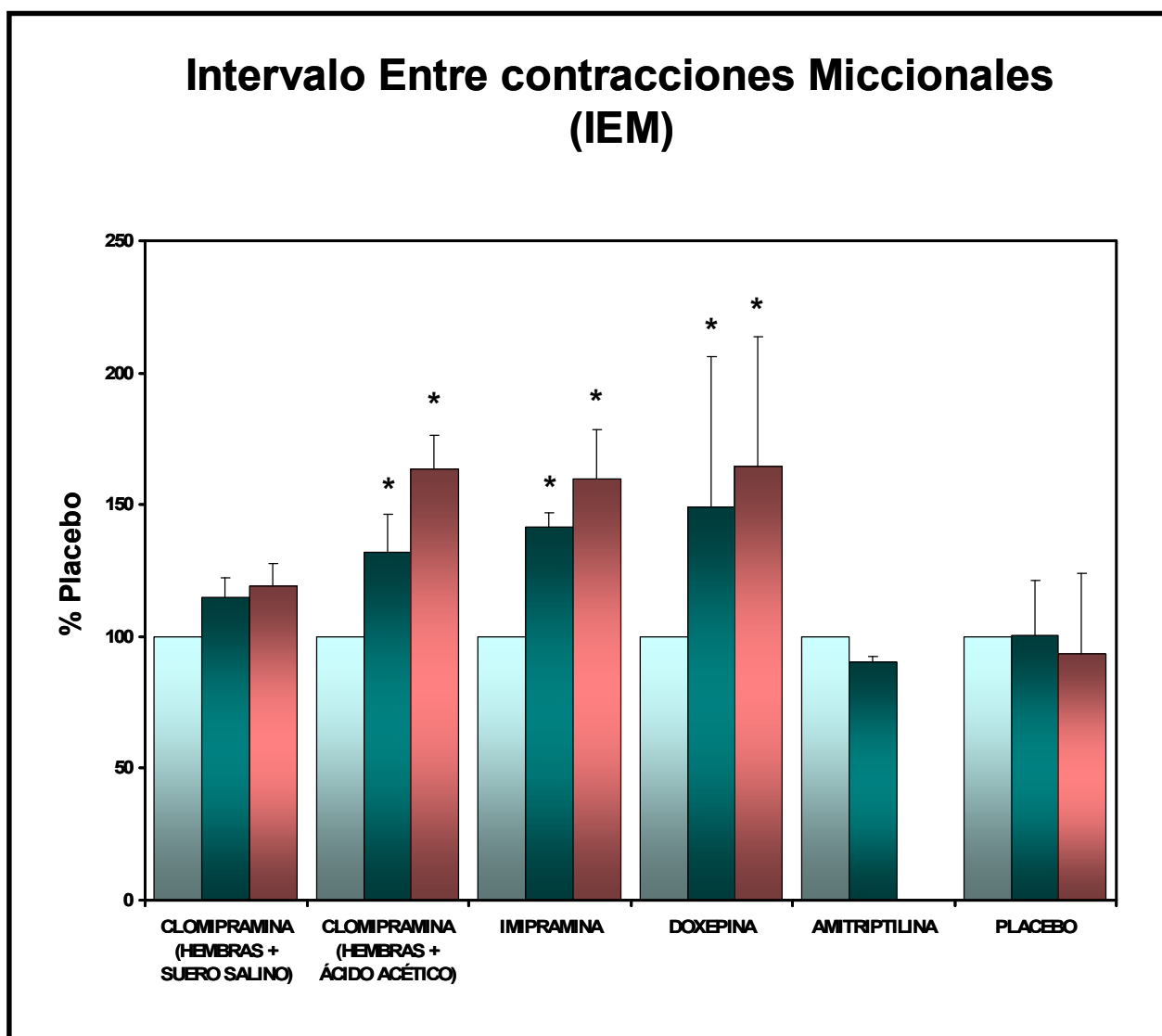


Figura 36. Efectos comparativos sobre el Intervalo Entre contracciones Miccionales (IEM) de suero salino (placebo) y distintos Antidepresivos Tricíclicos en conejos hembra estudiados en condiciones irritativas. Además, también se muestran los efectos de Clomipramina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetine. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

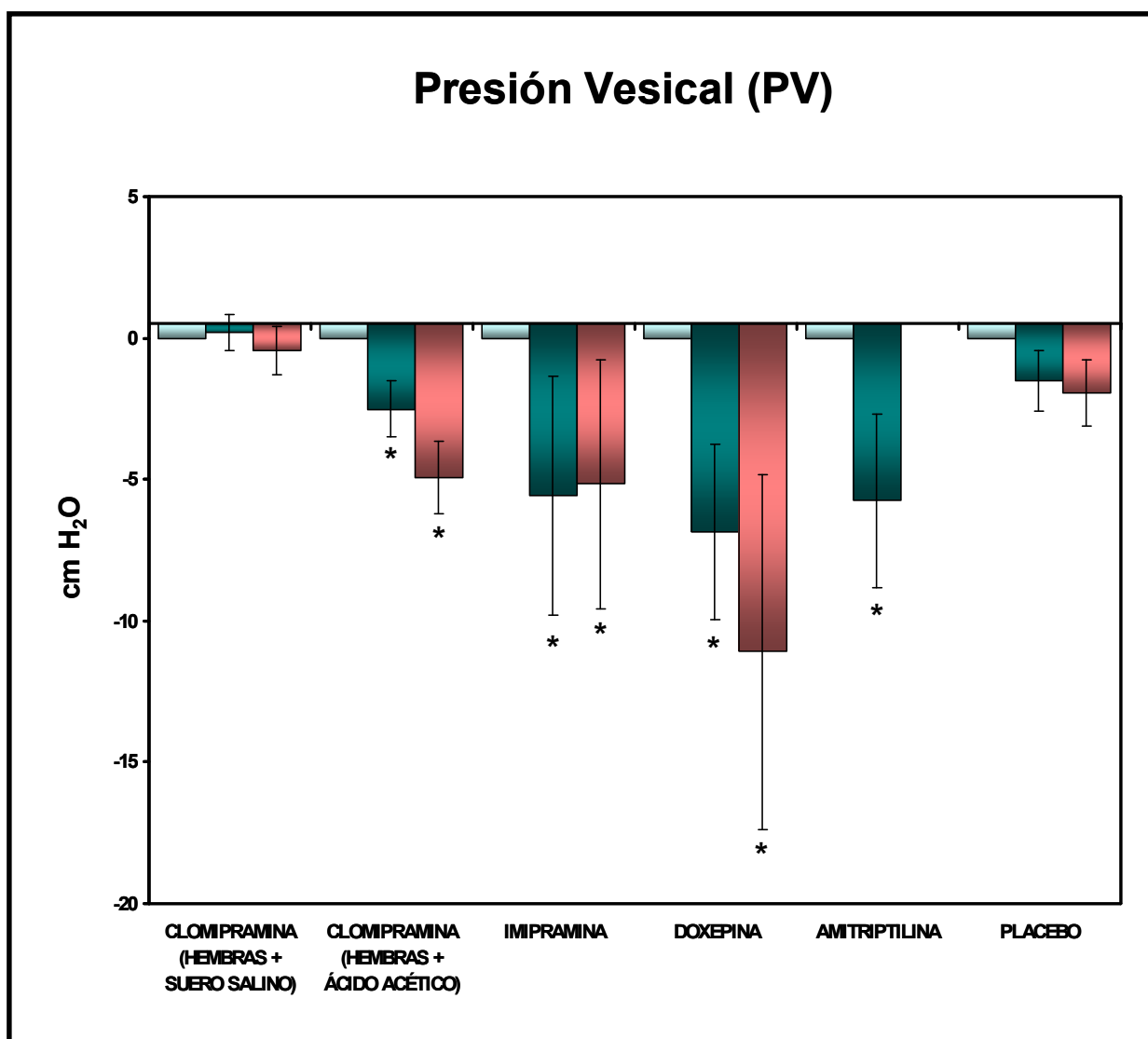


Figura 37. Efectos comparativos sobre la Presión Vesical (PV) de suero salino (placebo) y distintos Antidepresivos Tricíclicos en conejos hembra estudiados en condiciones irritativas. Además, también se muestran los efectos de Clomipramina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de 1 mg/Kg (barras verdes) o de 2 mg/Kg (barras rojas) de Clomipramina o Duloxetine. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

**Doxepina** ha sido bastante menos popular que imipramina, aunque existen investigaciones en animales donde se ha comprobado su validez como posible alternativa en el tratamiento de la IU (253). Este AT también ha sido estudiado en un ensayo clínico en 19 mujeres con aumento de la frecuencia miccional e IU, donde redujo significativamente las pérdidas de orina y varios parámetros cistométricos como la CV a la primera sensación o la máxima CV (168).

Dos ATs estudiados en esta Tesis Doctoral, **doxepina** y **amitriptilina**, muestran en estudios previos un efecto anticolinérgico marcado (254-256). Esto podría explicar los problemas que tuvimos al administrar la segunda dosis de amitriptilina y que con ninguno de estos dos compuestos vemos un aumento significativo de la actividad EMG-EAE. Por lo contrario, estos ATs modificaron algunos parámetros cistométricos, en concreto, 1 mg/Kg de amitriptilina incrementó la CV y disminuyó la PV, y doxepina, de forma dosis-dependiente, incrementó el IEM y disminuyó la PV, también tras la administración de 2 mg/Kg de doxepina se incrementó la CV y la DM.

Estos resultados indican que los cambios en los parámetros cistométricos producidos por doxepina y amitriptilina, se deben a un efecto relajante vesical, probablemente debido a un efecto anticolinérgico. En definitiva, estos dos fármacos no muestran mejores resultados promotores de almacenamiento de orina que los vistos con clomipramina e imipramina, aunque su efecto anticolinérgico parece ser más llamativo.



## **5.4 INHIBIDORES DUALES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA Y NOREPINEFRINA**

Un trabajo de experimentación animal destacable es el realizado por Thor KB y Katofiasc MA en 1995 (53) sobre los efectos de duloxetina en el TUI de 27 gatas. En este trabajo se infundió ácido acético o suero salino intravesicalmente, produciendo en el animal micciones repetidas, y también se estimuló el nervio pélvico eléctricamente controlando así los estímulos eferentes que llegan al SNC desde el TUI. Se midieron cambios en la CV y, mediante electrodos en el EUE, la actividad electromiográfica de dicho esfínter. Al final del estudio, se llegó a la conclusión de que duloxetina incrementa la CV y la actividad EMG-EUE bajo condiciones de irritación vesical. Se comprobó también que los receptores serotoninérgicos tipo 2, y los  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ -adrenérgicos no intervienen en el efecto de duloxetina sobre la vejiga, pero que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y serotoninérgicos tipo 1 sí intervienen en su actividad sobre el EUE.

En el primer ensayo clínico con duloxetina, Norton y cols (48) investigaron la eficacia y tolerancia de duloxetina en el tratamiento de la IU de esfuerzo mediante un estudio doble ciego, randomizado, controlado con placebo, que incluyó a 553 mujeres entre 18 y 65 años teniendo como síntoma predominante la IU de esfuerzo. Las pacientes fueron aleatoriamente tratados con un placebo (138 pacientes) o con tres dosis diferentes de duloxetina: 20 mg/día (138 pacientes); 40 mg/día (137 pacientes); u 80 mg/día (140 pacientes). La respuesta al tratamiento fue investigada después de 12 semanas, mediante valoración de los episodios de IU y mediante cuestionarios relacionados con la impresión global del paciente sobre su mejoría y sobre la calidad de vida relacionada con la IU. Se confirmó una significativa reducción de los episodios de IU que mejoró con el incremento de la dosis de duloxetina y que se correlacionó con los baremos subjetivos indagados mediante cuestionario. La reducción media de episodios de IU con el placebo fue de un 41%, comparada con un 54% para

duloxetina en dosis de 20 mg/día, con un 59% para la dosis de 40 mg/día y con un 64% para la dosis de 80 mg/día. La mitad de los pacientes que recibieron dosis de 80 mg/día, tuvieron una reducción de episodios de IU superior o igual al 64%, mientras que el 67% tuvo una reducción mayor o igual al 50%. Estas mejorías notables sucedieron asociadas a una reducción de la frecuencia miccional y fueron más llamativas en un subgrupo de 63 pacientes en los que la IU de esfuerzo era más severa, con más de 14 episodios de IU por semana. Esta mejoría no estuvo exenta de efectos secundarios, que motivaron abandonos del 9%, 12% y 15%, respectivamente, en función del incremento de dosis. El síntoma de intolerancia más común estuvo relacionado con náuseas, pero ni éste ni ninguno de los otros efectos secundarios tuvo una relevancia patológica significativa.

Un renovado interés en los efectos que algunos antidepresivos producen en el TUI, ha sido motivado por recientes ensayos clínicos donde se ha visto la eficacia y seguridad de duloxetina en mujeres con IU de esfuerzo (48-51,175-177,257-263). En esta Tesis Doctoral, los mayores efectos de **duloxetina** sobre la actividad EMG-EAE se vieron en condiciones de irritabilidad. Por otro lado, **milnacipran** tuvo efecto sobre algunos parámetros urodinámicos, pero no tuvo efecto a nivel del esfínter estriado. Estos resultados muestran experimentalmente, que este tipo de fármacos tienen efecto a distintos niveles del TUI, y que seguramente por la diferente selectividad sobre la inhibición de 5-HT y NE, la potencia del efecto y su localización es distinta.

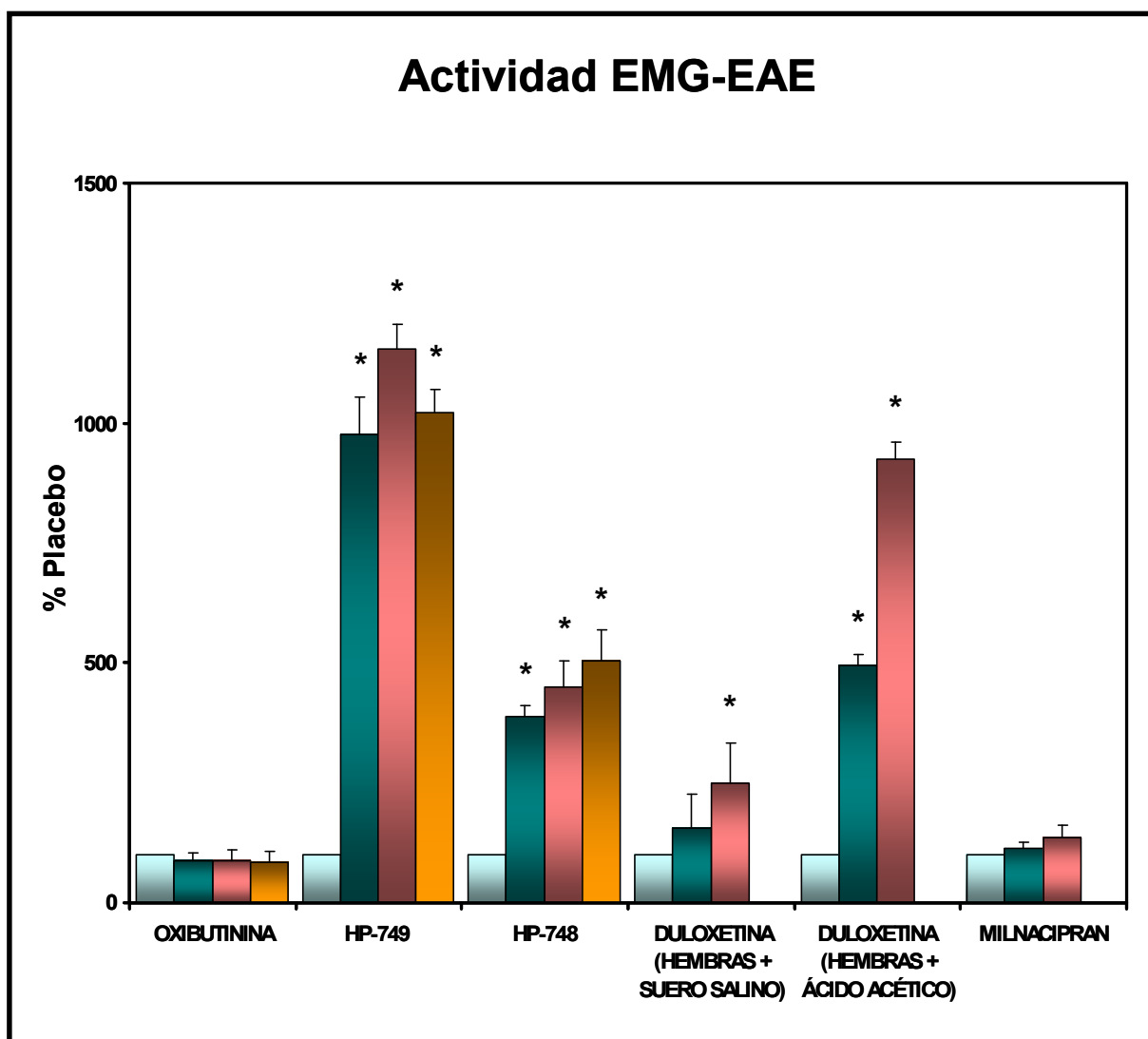


Figura 38. Efectos comparativos sobre la actividad Electromiográfica del Esfínter Anal Externo (EMG-EAE) de Oxibutinina, Besipirdina (HP-749) y su metabolito HP-748, Duloxetina y Milnacipran en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Duloxetina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de la primera dosis (barras verdes), de la segunda dosis (barras rojas) o de la tercera dosis (barras naranjas) de los compuestos correspondientes. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

En los animales, de ambos sexos, donde se infundió ácido acético diluido, se incrementó con ambas dosis de **duloxetina** la CV, la DM, el IEM y la actividad EMG-EAE, siendo este incremento mayor en hembras que en machos. En nuestro estudio se muestra que duloxetina es un fármaco que principalmente estimula la actividad del esfínter estriado en **hembras en condiciones de irritabilidad vesical**, datos correlacionados con un estudio previo en gatos en el que duloxetina incrementó la CV y la actividad EMG-EUE actuando en la médula espinal a nivel del núcleo de Onuf (53), con otros estudios donde también se mostró el mecanismo de acción de duloxetina mediante estudios urodinámicos en mujeres sanas, en los que se confirmó que duloxetina actúa sobre la excitabilidad del nervio pudendo y sobre la contractilidad del esfínter estriado (53,54,264), y ratificando los resultados obtenidos en otros estudios donde se observó que puede ser un tratamiento útil para la IU de esfuerzo femenina (53,48-51,175-177,257-263). A pesar de estos datos, duloxetina también mostró tener un efecto significativo promoviendo la continencia en **conejos machos**, como ha sido también descrito en varios estudios en los que se sugirió que duloxetina era eficaz en hombres con IU de esfuerzo después de una prostatectomía o una cistectomía (263,265).

Los datos de esta Tesis Doctoral apoyan la hipótesis de que duloxetina tiene mayor efecto en condiciones que activan las fibras aferentes nociceptivas (bajo condiciones de irritabilidad vesical), sugiriendo que duloxetina afecta al procesamiento sensitivo, especialmente a las vías aferentes nociceptivas en conejos, como fue descrito previamente en gatos (53).

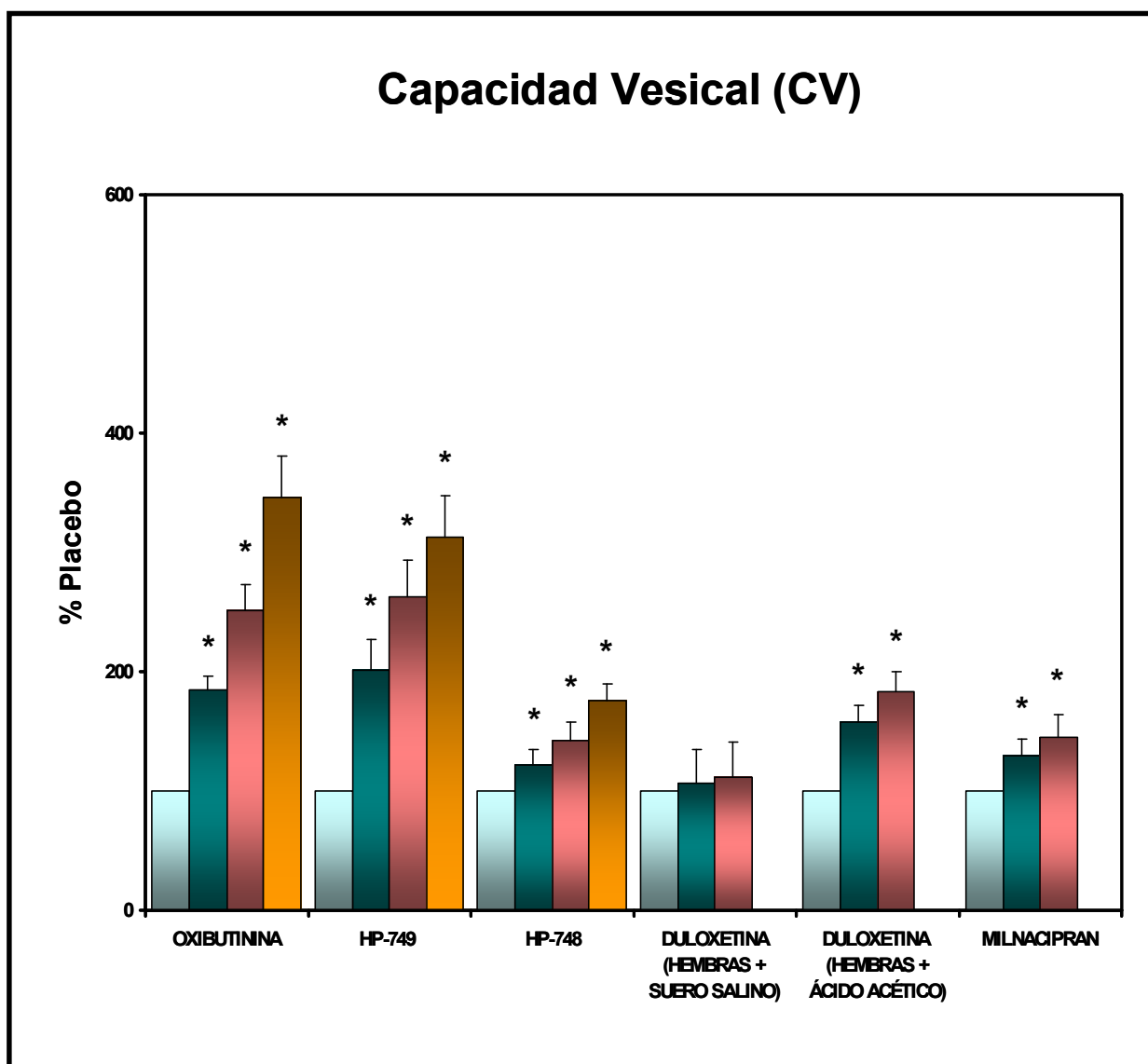


Figura 39. Efectos comparativos sobre la Capacidad Vesical (CV) de Oxibutinina, Besipirdina (HP-749) y su metabolito HP-748, Duloxetina y Milnacipran en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Duloxetina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de la primera dosis (barras verdes), de la segunda dosis (barras rojas) o de la tercera dosis (barras naranjas) de los compuestos correspondientes. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

En estudios donde se han comparado varios compuestos de la familia de los SNRIs, se han visto que actúan de la misma manera, pero que su potencia es muy diferente. Por ejemplo, en un estudio del TUI en gatos, venlafaxina produjo efectos fisiológicos sobre la función vesical y la actividad esfinteriana similares a los vistos con duloxetina, pero esos efectos fueron de una magnitud 10 veces menor (52). Esta diferencia cuantitativa en la magnitud del efecto se debe a que duloxetina tiene al menos 100 veces más afinidad por moléculas transportadoras de 5-HT y 300 veces más afinidad por las transportadoras de NE, en comparación con venlafaxina. Así pues, venlafaxina no tiene efectos significativos sobre la dinámica miccional a dosis clínicas que se utilizan para el tratamiento de la depresión. En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que ocurre una cosa similar con milnacipran, un fármaco que a dosis similares a duloxetina prácticamente no promueve el almacenamiento de orina, y del que se necesitarían dosis muy elevadas para conseguir un efecto similar al de duloxetina.

Comparando nuestros resultados entre un AT clásico como es **clomipramina** y el principal antidepresivo de la familia de los SNRIs, **duloxetina**, vemos que ambos fármacos actúan de manera más potente en **conejos hembras** que en machos, y bajo **condiciones de irritabilidad vesical** que en condiciones de “normalidad”. En condiciones irritativas, duloxetina muestra una mayor capacidad para promover el almacenamiento de orina ya que incrementa en mayor grado la mayoría de los parámetros cistométricos estudiados (CV, DM, IEM) y también se muestra más potente estimulando la actividad EMG-EAE, principal mecanismo de acción por el que se considera un fármaco eficaz en el tratamiento de la IU de esfuerzo.

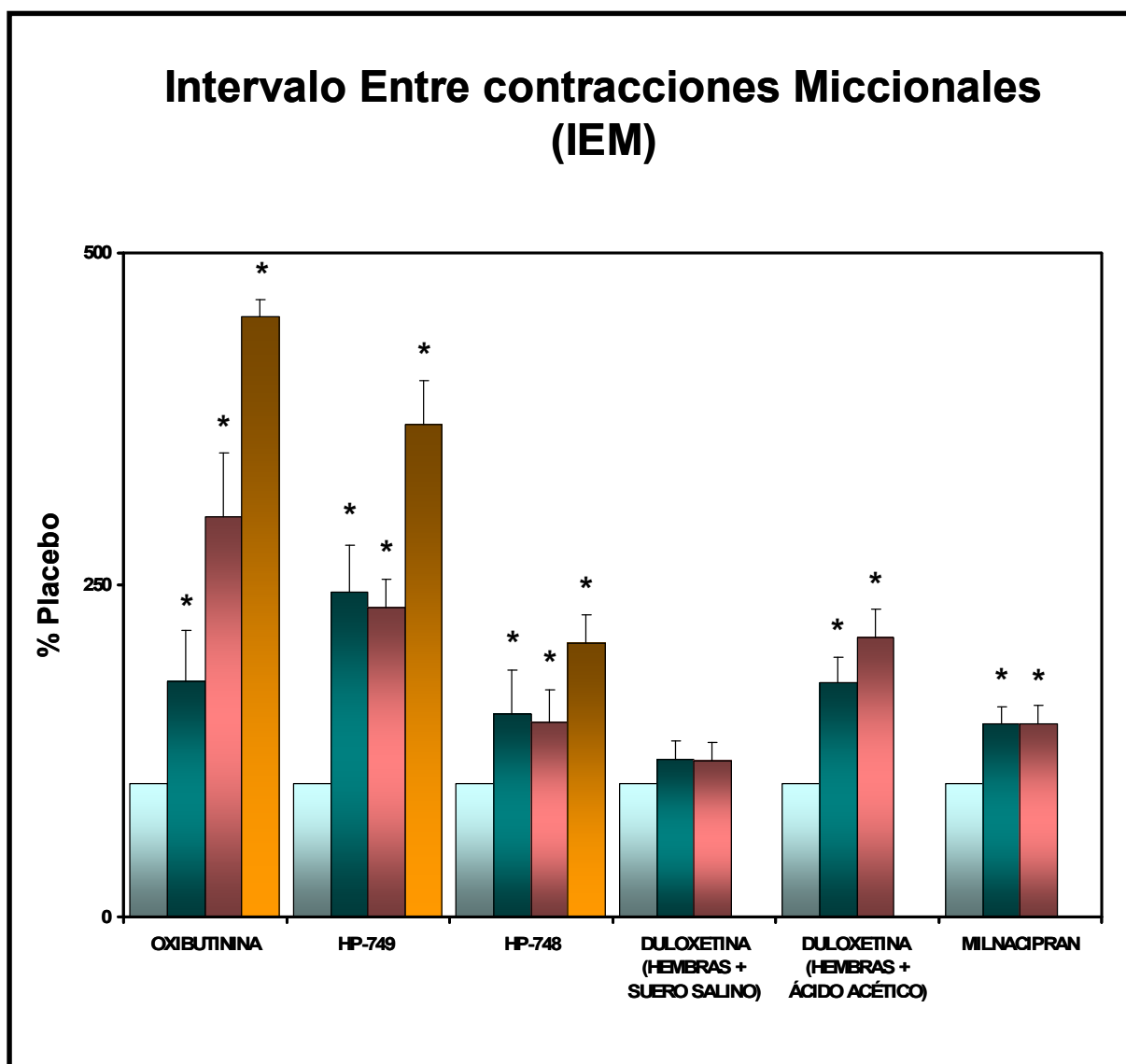


Figura 40. Efectos comparativos sobre el Intervalo Entre contracciones Miccionales (IEM) de Oxibutinina, Besipirdina (HP-749) y su metabolito HP-748, Duloxetina y Milnacipran en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Duloxetina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de la primera dosis (barras verdes), de la segunda dosis (barras rojas) o de la tercera dosis (barras naranjas) de los compuestos correspondientes. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

Por otro lado, la clomipramina muestra un efecto relajante vesical, disminuyendo la PV, que no se detecta con duloxetina, seguramente porque clomipramina sea un fármaco con actividad anticolinérgica a nivel del TUI, y de la cual duloxetina carece. Estos datos sugieren que duloxetina promueve el almacenamiento de orina incrementando principalmente la resistencia uretral a la salida de orina, y clomipramina promueve este almacenamiento de orina a través del incremento de la resistencia uretral y relajando la vejiga, aunque la suma de estos dos efectos continúa siendo menor que el efecto de duloxetina para promover el almacenamiento de orina.

Estos dos compuestos han sido los únicos que, en esta Tesis Doctoral, se han estudiado en conejos machos y hembras. Los métodos utilizados para la inserción del catéter vesical han sido distintos en machos y hembras, pero para la medición de la actividad EMG-EAE, el método ha sido idéntico. En cuanto a este último parámetro electromiográfico, los efectos de duloxetina y clomipramina incrementando de forma dosis-dependiente la actividad EMG-EAE fueron más potentes en los grupos de conejos hembras, comparados con los de conejos machos. Además, los efectos de estos dos compuestos sobre los parámetros cistométricos, aunque se utilizara un modelo de cateterismo diferente, también parecen ser mayores en hembras que en machos, aunque en ambas especies animales parecen tener un efecto promotor del almacenamiento de orina en condiciones de irritación vesical.



## **5.5 ANTIMUSCARÍNICOS**

La **oxibutinina** es un anticolinérgico no selectivo muy potente que ha sido utilizado durante muchos años en el tratamiento de la IU, aunque ahora no se puede utilizar en nuestro país por los marcados efectos secundarios que produce.

Los fármacos antimuscarínicos son utilizados frecuentemente para el tratamiento de la **hiperactividad vesical** (61-63). Estos compuestos bloquean los receptores muscarínicos del detrusor, responsables de la contractilidad vesical, y producen que las contracciones espontáneas del detrusor sean menores, permitiendo un mejor llenado vesical y reduciendo la urgencia de la micción. Sin embargo, el empleo de antimuscarínicos está asociado con ciertos efectos secundarios, incluyendo boca seca, constipación, sedación, taquicardia, visión borrosa y empeoramiento de la función cognitiva (266,267).

Oxibutinina es el antimuscarínico clásico utilizado durante más de 30 años (61,268), y que se ha ido sustituyendo por otros fármacos más selectivos de los receptores muscarínicos M3, como solifenacina o darifenacina. Los efectos que oxibutinina produce sobre la dinámica miccional se correlacionan exclusivamente con su actividad anticolinérgica y no aparecen relacionados con otras acciones. (269) Sin embargo, la afinidad de oxibutinina por receptores muscarínicos en otras localizaciones como la glándula parótida, es mayor que sobre la vejiga, (270) produciendo sequedad de boca en un gran número de casos.

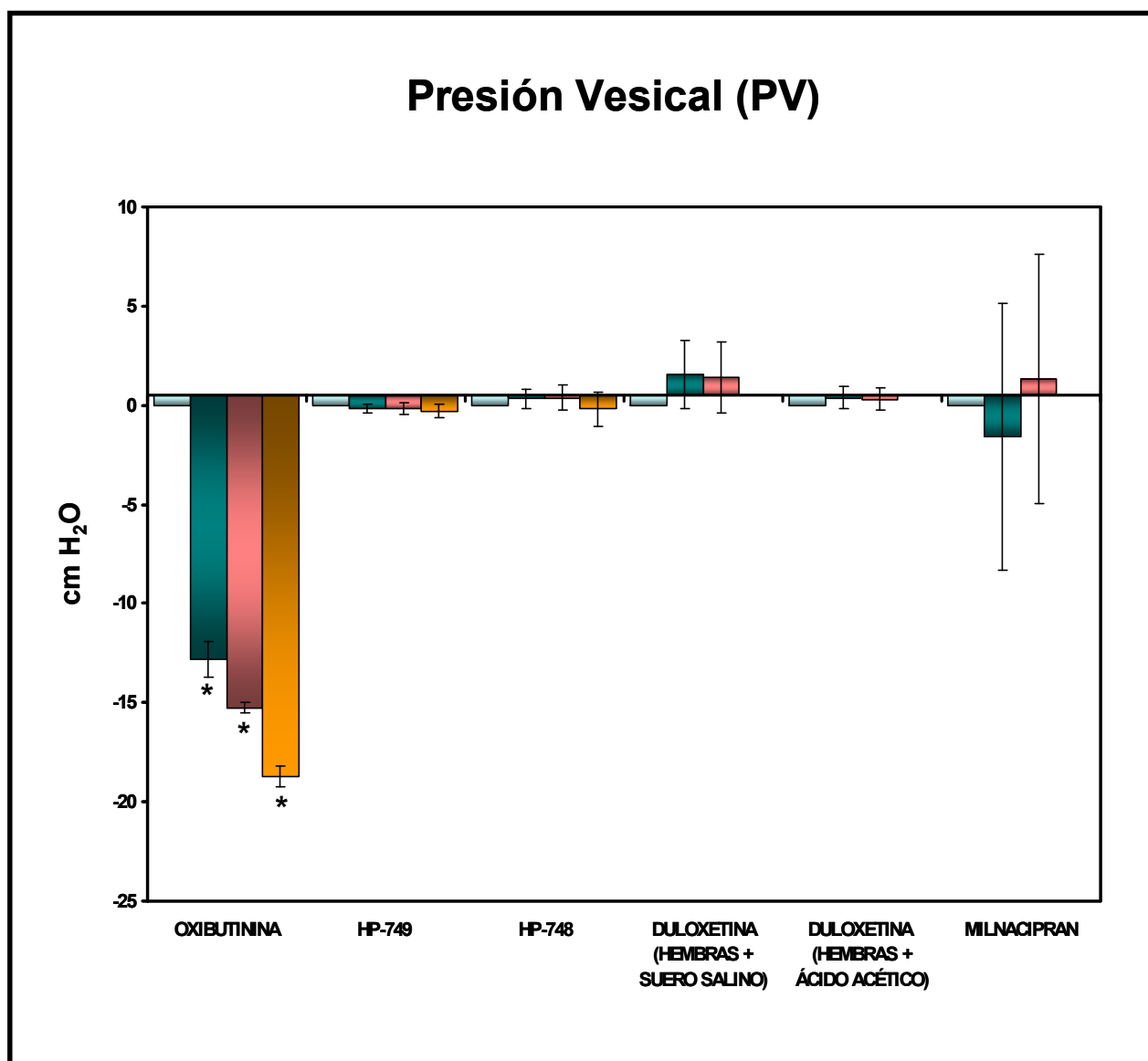


Figura 41. Efectos comparativos sobre la Presión Vesical (PV) de Oxibutinina, Besipirdina (HP-749) y su metabolito HP-748, Duloxetina y Milnacipran en conejos hembra estudiados en condiciones de irritativas. Además, también se muestran los efectos de Duloxetina en condiciones de “normalidad”. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales cada una, representando los valores tras la administración del placebo (barras azules), de la primera dosis (barras verdes), de la segunda dosis (barras rojas) o de la tercera dosis (barras naranjas) de los compuestos correspondientes. \*Indica diferencias significativas con respecto al placebo ( $p < 0,05$ ) (Wilcoxon rank test).

La administración IV de 3 dosis consecutivas de oxibutinina, produjo por sus efectos anticolinérgicos, un incremento muy llamativo dosis-dependiente de la CV, del VM, del IEM y de la DM, y por otro lado, una disminución dosis-dependiente de la PV y la AM. Estos efectos fueron de gran magnitud, aunque a diferencia de la mayoría de los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral, no se produjo ningún cambio en la actividad EMG-EAE, un resultado esperado ya que su activación se produce principalmente por el aumento de 5-HT y NE en el núcleo de Onuf.

Dentro de las diferencias lógicas que existen entre los distintos compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral, hemos podido ver que el efecto de estos fármacos se produce a distinto nivel en el TUI, siendo el efecto de compuestos como duloxetine principalmente a nivel del esfínter estriado, el de otros como clomipramina tanto a nivel del detrusor como del esfínter estriado, y el de otros compuestos como oxibutinina es exclusivamente a nivel del detrusor.

## **5.6 BESIPIRDINA: UNA NUEVA ALTERNATIVA FARMACOLÓGICA PARA PROMOVER EL ALMACENAMIENTO DE ORINA**

Estudios neurofarmacológicos y de comportamiento han mostrado que **besipirdina** puede estimular la actividad adrenérgica y serotoninérgica (201,204,205,271). Estos estudios muestran la capacidad de besipirdina para estimular la actividad de NE a través del bloqueo de receptores  $\alpha 2$ -adrenérgicos y de la inhibición de la recaptación de 5-HT y NE a nivel cortical (201,205,271).

Otros estudios muestran que besipirdina posee actividad sobre múltiples neurotransmisores (201,204-206). Por ejemplo, no se ha podido demostrar que besipirdina tenga un efecto colinérgico directo en el corazón,

aunque si que se ha visto que incrementa la actividad colinérgica y adrenérgica en el SNC (197,209).

En esta Tesis Doctoral, hemos obtenido resultados que atribuyen a besipirdina un potencial efecto para promover el almacenamiento de orina por medio del incremento de la resistencia uretral a la salida de orina. Este efecto, aunque más potente, es semejante al producido por los compuestos testados cuyo principal mecanismo de acción es inhibir la recaptación de 5-HT y NE a nivel del SNC, y es diferente al efecto de los compuestos cuyo principal característica es que producen un efecto anticolinérgico.

Un análisis comparativo importante que se ha realizado en esta Tesis Doctoral es el llevado a cabo entre **duloxetina**, un SNRI ampliamente estudiado y que acaba de salir al mercado como tratamiento específico de la IU de esfuerzo femenina, y **besipirdina**, un nuevo fármaco cuyo efecto sobre e TUI es la primera vez que se estudia. Besipirdina y duloxetina produjeron efectos semejantes sobre la actividad EMG-EAE y sobre parámetros funcionales de la vejiga, aunque en este estudio, besipirdina mostró un efecto más potente que duloxetina en conejos hembra bajo condiciones de irritabilidad vesical. Así, los efectos de 1 mg/Kg de besipirdina fueron mayores sobre la CV, el VM, el IEM y la actividad EMG-EAE que los observados con la administración de dosis progresivas de 1 y 2 mg/Kg de duloxetina. Esto sugiere que, aunque la potencia de acción es diferente, ambos compuestos tienen efecto sobre el SNC inhibiendo la recaptación de 5-HT y NE en el núcleo de Onuf para facilitar la contractilidad del esfínter estriado durante el almacenamiento de orina.

En un estudio en tejido cerebral de ratas, se mostró que besipirdina y su metabolito HP-748 incrementaron la liberación de NE en el SNC, aunque el efecto a este nivel de besipirdina fue unas 5 veces más potente que el de su metabolito (201). Esto puede explicar que en nuestro estudio no se vean muchos cambios significativos de los parámetros cistométricos y electromiográficos con HP-748 en comparación con los efectos vistos tras la administración de besipirdina, ya que en nuestro modelo animal para el estudio de la IU de esfuerzo femenina, se ha visto que los fármacos eficaces para el tratamiento de esta patología actúan principalmente a nivel central, dejando en un segundo plano el efecto que ejercen a nivel periférico sobre receptores adrenérgicos. Esto se debe a que su efecto adrenérgico a nivel periférico, depende de la localización y el tipo de receptores adrenérgicos sobre los que predomine el efecto del compuesto.

## **VI. CONCLUSIONES**

Las **conclusiones** más relevantes de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

**PRIMERA:** Nuestro **modelo animal** para la investigación simultánea de la fisiología vesical y esfinteriana ha quedado **validado** en todo nuestro trabajo, y cotejada su validez en comparaciones con métodos similares empleados por grupos nacionales e internacionales.

**SEGUNDA:** Este estudio proporciona una fuerte evidencia de que los Antidepresivos Tricíclicos tienen efectos sobre la dinámica miccional, en grado variable según el fármaco, produciendo relajación y acomodación vesical, y contracción esfinteriana.

**TERCERA:** Por primera vez, se ha visto que **clomipramina** es el Antidepresivo Tricíclico estudiado que favorece en mayor grado el almacenamiento de orina, mostrando ser más eficaz en hembras y en condiciones de irritabilidad vesical.

**CUARTA:** **Duloxetina** tiene un **efecto** más potente promoviendo el almacenamiento de orina en conejos hembras que en machos, siendo este efecto mucho más llamativo **en condiciones de irritabilidad vesical**.

**QUINTA:** Este estudio proporciona evidencias de que **duloxetina** tiene un efecto promotor del almacenamiento de orina **más potente** que **milnacipran**

y que los **Antidepresivos Tricíclicos** estudiados, debiéndose su eficacia principalmente al incremento de la actividad del esfínter estriado.

**SEXTA: Besipirdina** posee un **gran efecto potenciando la actividad electromiográfica del esfínter anal externo** y reduciendo la irritación vesical en conejos hembras estudiadas bajo condiciones de irritación vesical.

**SEPTIMA: Besipirdina** es **más potente**, promoviendo el almacenamiento de orina, que los **Antidepresivos Tricíclicos** y los **Inhibidores duales de la recaptación de serotonina y norepinefrina** estudiados.

**OCTAVA: Oxibutinina**, a las dosis que se ha estudiado, es el fármaco que produce **los efectos más potentes** sobre los **parámetros cistométricos** evaluados. Por el contrario, oxibutinina no estimula la actividad electromiográfica del esfínter anal externo, siendo su efecto únicamente a nivel vesical.

**NOVENA:** Se confirma la **extraordinaria importancia** de la **investigación animal *in vivo*** para la orientación de estudios clínicos. Esta afirmación se confirmó con duloxetina, que fue inicialmente estudiada en gatos, y seguramente se confirmará con besipirdina, cuyo único trabajo *in vivo* hasta el momento es el aportado en esta Tesis Doctoral. Cabe resaltar que los ensayos preclínicos necesitan de la investigación animal *in vivo* con determinaciones de excelente metodología, porque eso orienta



definitivamente sobre las respuestas esperadas, y permite acercarse a la clínica con más seguridades. En conclusión, **besipirdina** ha sido propuesta para ser estudiada en mujeres con incontinencia urinaria de esfuerzo, y esos ensayos clínicos están actualmente en funcionamiento.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Nordling J. The aging bladder-a significant but underestimated role in the development of lower urinary tract symptoms. *Exp Gerontol* 2002; 37: 991-999.
- 2.- Andersson KE, Hedlund P. Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urology* 2002; 60 (Supl 5A): 13-21.
- 3.- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61: 37-49.
- 4.- Minassian VA, Drutz HP, Al-Badr A. Urinary incontinence as a worldwide problem. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 82: 327-328
- 5.- Patrick DL, Martin ML, Bushnell DM, Yalcin I, Wagner TH, Buesching DP. Quality of life of women with urinary incontinence: further development of the incontinence quality of life instrument (I-QOL). *Urology* 1999; 53: 71-76.
- 6.- Mariappan P, Alhasso A, Ballantyne Z, Grant A, N'Dow J. Duloxetine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) for the treatment of stress urinary incontinence: a systematic review. *Eur Urol.* 2007 Jan;51(1):67-74.
- 7.- Wein AJ. Pharmacology of incontinence. *The Urologic Clinics of North America* 1995; 22: 557-577.
- 8.- Vela Navarrete R, Raz S. Control farmacológico de los trastornos urodinámicos. Ed Científico Médica. Madrid, 1979.
- 9.- Khanna OP, Heber D, Gonick P. Cholinergic and adrenergic neuroreceptors in urinary tract of female dogs. Evaluation of function with pharmacodynamics. *Urology* 1975; 5: 616-623.
- 10.- Vela Navarrete R, Perez Martinez FC, Cabrera Perez J, Ramirez Perez del Yerro M, Gonzalez Enguita C. Duloxetina y otros antidepresivos

tricíclicos: efectos farmacodinámicos en el tracto urinario inferior. *Actas Urol Esp* 2003; 27: 751-766.

11.- Raezer DM, Benson GS, Wein AJ, Duckett JW Jr. The functional approach to the management of the pediatric neuropathic bladder: a clinical study. *J Urol* 1977; 117: 649-654.

12.- Fraser MO, Chancellor MB. Neural control of the urethra and development of pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *BJU Int* 2003; 91: 743-748.

13.- de Groat WC, Booth AM, Yoshimura N. Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. En: Maggi CA. *The autonomic nervous system*. Harwood Academic Publishers, London, 1993; pp. 227-289.

14.- Bissacola NK, Finkbeiner EA. *Lower urinary tract function and dysfunction: diagnosis and management*. Appleton-Century-Crsgts. New York, 1978.

15.- Park JM, Bloom DA, McGuire EJ. The guarding reflex revisited. *Br J Urol* 1997; 80: 940-945.

16.- de Groat WC. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 1998; 50 (Suppl 6A): 36-52.

17.- Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 1998; 50 (Suppl 6A): 57-67.

18.- Ueyama T, Mizuno N, Nomura S, Konishi A, Itoh K, Arakawa H. Central distribution of afferent and efferent components of the pudendal nerve in cat. *J. Comp. Neurol* 1984; 222: 38-46.

19.- Andersson KE. Treatment of the overactive bladder: possible central nervous system drug targets. *Urology* 2002; 59 (Suppl 5A): 18-24.

- 20.- Blok BF, Willemsen AT, Holstege G. A PET study on brain control of micturition in humans. *Brain* 1997; 120: 111-121.
- 21.- de Groat WC, Yoshimura N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 691-721.
- 22.- Matsuura S, Downie JW, Allen GV. Micturition evoked by glutamate microinjection in the ventrolateral periaqueductal gray is mediated through Barrington's nucleus in the rat. *Neuroscience*. 2000;101(4):1053-61.
- 23.- Blok BF, Holstege G. Two pontine micturition centres in the cat are not interconnected directly: implications for the central organization of micturition. *J Comp Neurol* 1999; 403: 209-218.
- 24.- Rajaofetra N, Passagia JG, Marlier L, Poulat P, Pellas F, Sandillon F, et al. Serotonergic, noradrenergic, and peptidergic innervation of Onuf's nucleus of normal and transected spinal cords of baboons (*Papio papio*). *J Comp Neurol* 1992; 318: 1-17.
- 25.- Yoshiyama M, de Groat WC. Supraspinal and spinal alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid and N-methyl-D-aspartate glutamatergic control of the micturition reflex in the urethane-anesthetized rat. *Neuroscience*. 2005;132(4):1017-26.
- 26.- Vela Navarrete R, Pérez Martínez FC, Pardo Montero M, González Enguita C, García Cardoso JV. Esfínter externo: Control neural y farmacológico. Un nuevo esquema neurohumoral de la continencia y la micción. *Actas Urol Esp* 2006; 30: 52-58.
- 27.- Finkbeiner AE, Barbour GL, Prissada NK. Pharmacology of the urinary tract. *Appelton-Century-Cnsgts*. New York, 1982.
- 28.- Thor KB. Serotonin and norepinephrine involvement in efferent pathways to the urethral rhabdosphincter: implications for treating stress urinary incontinence. *Urology* 2003; 62 (Suppl 1): 3-9.

- 29.- Yoshimura N, de Groat WC. Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol* 1997; 4: 111-125.
- 30.- Oh SJ, Hong SK, Son H, Paick JS, Ku JH. Quality of life and disease severity in Korean women with stress urinary incontinence. *Urology* 2005; 66: 69-73.
- 31.- Hampel C, Artibani W, Espuna-Pons M, Haab F, Jackson S, Romero J, et al. Understanding the burden of stress urinary incontinence in Europe: a qualitative review of the literature. *Eur Urol* 2004; 46: 15-27.
- 32.- Kamo I, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Urethral closure mechanisms under sneeze-induced stress condition in rats: a new animal model for evaluation of stress urinary incontinence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R356-R365.
- 33.- Morrison JF. The physiological mechanisms involved in bladder emptying. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1997; 184: 15-18.
- 34.- Kamo I, Cannon TW, Conway DA, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, et al. The role of bladder-to-urethral reflexes in urinary continence mechanisms in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F434-F441.
- 35.- Gilpin SA, Gosling JA, Smith AR, Warrell DW. The pathogenesis of genitourinary prolapse and stress incontinence of urine. A histological and histochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 15-23.
- 36.- Bukovsky A, Copas P, Caudle MR, Cekanova M, Dassanayake T, Asbury B, et al. Abnormal expression of p27kip1 protein in levator ani muscle of aging women with pelvic floor disorders-a relationship to the cellular differentiation and degeneration. *BMC Clin Pathol* 2001; 1: 4.
37. Smith AR, Hosker GL, Warrell DW. The role of pudendal nerve damage in the aetiology of genuine stress incontinence in women. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 29-32.

38. Snooks SJ, Swash M, Mathers SE, Henry MM. Effect of vaginal delivery on the pelvic floor: a 5-year follow-up. *Br J Surg* 1990; 77: 1358-1360.
39. Takahashi S, Homma Y, Fujishiro T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Electromyographic study of the striated urethral sphincter in type 3 stress incontinence: evidence of myogenic-dominant damages. *Urology* 2000; 56: 946-950.
40. Kondo Y, Homma Y, Takahashi S, Kitamura T, Kawabe K. Transvaginal ultrasound of urethral sphincter at the mid urethra in continent and incontinent women. *J Urol* 2001; 165: 149-152.
- 41.- Castro-Diaz D, Amoros MA. Pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *Curr Opin Urol* 2005; 15: 227-230.
- 42.- Nissenkorn I, Shalev M, Radziszewski P, Dobronski P, Borkowski A, de Jong PR. Patient-adjusted intermittent electrostimulation for treating stress and urge urinary incontinence. *BJU Int* 2004; 94: 105-109.
- 43.- Amaro JL, Oliveira Gameiro MO, Padovani CR. Treatment of urinary stress incontinence by intravaginal electrical stimulation and pelvic floor physiotherapy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003; 14: 204-208.
- 44.- Appell RA, Dmochowski RR, Herschorn S. Urethral injections for female stress incontinence. *BJU Int* 2006; 98 (Suppl 1): 27-30.
- 45.- Perimenis P, Giannitsas K. Injectables for the treatment of stress urinary incontinence: current use and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 1441-1447.
- 46.- Petero VG Jr, Diokno AC. Comparison of the long-term outcomes between incontinent men and women treated with artificial urinary sphincter. *J Urol* 2006; 175: 605-609.
- 47.- Ngninkeu BN, van Heugen G, di Gregorio M, Debie B, Evans A. Laparoscopic artificial urinary sphincter in women for type III incontinence: preliminary results. *Eur Urol* 2005; 47: 793-797.

- 48.- Norton PA, Zinner NR, Yalcin I, Bump RC. Duloxetine versus placebo in the treatment of stress urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 40-48.
- 49.- Dmochowski RR, Miklos JR, Norton PA, Zinner NR, Yalcin I, Bump RC. Duloxetine versus placebo in the treatment of North American women with stress urinary incontinence. *J Urol* 2003; 170: 1259-1263.
- 50.- Millard RJ, Moore K, Rencken R, Yalcin I, Bump RC. Duloxetine vs placebo in the treatment of stress urinary incontinence: a four-continent randomized clinical trial. *BJU Int* 2004; 93: 311-318.
- 51.- Hurley DJ, Turner CL, Yalcin I, Viktrup L, Saygani SK. Duloxetine for the treatment of stress urinary incontinence in women: an integrated analysis of safety. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 125: 120-128.
- 52.- Katofiasc MA, Nissen J, Audia JE, Thor KB. Comparison of the effects of serotonin selective, norepinephrine selective, and dual serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors on lower urinary tract function in cats. *Life Sci* 2002; 71: 1227-1236.
- 53.- Thor KB, Katofiasc MA. Effects of duloxetine, a combined serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on central neural control of lower urinary tract function in the chloralose-anesthetized female cat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1014-1024.
- 54.- Boy S, Reitz A, Wirth B, Knapp PA, Braun PM, Haferkamp A, et al. Facilitatory neuromodulative effect of duloxetine on pudendal motor neurons controlling the urethral pressure: a functional urodynamic study in healthy women. *Eur Urol* 2006; 50: 119-125.
- 55.- Abrams P, Freeman R, Anderstrom C, Mattiasson A. Tolterodine, a new antimuscarinic agent: as effective but better tolerated than oxybutynin in patients with an overactive bladder. *Br J Urol* 1998; 81: 801-810.



- 56.- Staskin DR, MacDiarmid SA. Pharmacologic management of overactive bladder: practical options for the primary care physician. *Am J Med* 2006; 119 (Suppl 1): 24-28.
- 57.- Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int* 2001; 87: 760-766.
- 58.- Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 2003; 20: 327-336.
- 59.- Chapple CR, Yamanishi T, Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology* 2002; 60 (Suppl 5A): 82-89.
- 60.- Tulikangas PK, Ayers A, O'Sullivan DM. A meta-analysis comparing trials of antimuscarinic medications funded by industry or not. *BJU int* 2006; 98: 377-380.
- 61.- Appell RA. The newer antimuscarinic drugs: bladder control with less dry mouth. *Cleve Clin J Med* 2002; 69: 761-769.
- 62.- Andersson KE. Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. *Lancet Neurol* 2004; 3: 46-53.
- 63.- Siddiqui MA, Perry CM, Scott LJ. Oxybutynin extended-release: a review of its use in the management of overactive bladder. *Drugs* 2004; 64: 885-912.
- 64.- Stach-Lempinen B, Kirkinen P, Laippala P, Metsanoja R, Kujansuu E. Do objective urodynamic or clinical findings determine impact of urinary incontinence or its treatment on quality of life?. *Urology* 2004; 63: 67-71.
- 65.- Woderich R, Fowler CJ. Management of lower urinary tract symptoms in men with progressive neurological disease. *Curr Opin Urol* 2006; 16: 30-36.

- 66.- Chapple C, Khullar V, Gabriel Z, Dooley JA. The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2005; 48: 5-26.
- 67.- Erdem N, Chu FM. Management of overactive bladder and urge urinary incontinence in the elderly patient. *Am J Med* 2006; 119: 29S-36S.
- 68.- Krahn HP, Morales PA. The effect of pudendal nerve anesthesia on urinary continence after prostatectomy. *J Urol* 1965; 94: 282-285.
- 69.- Ficazzola MA, Nitti VW. The etiology of post-radical prostatectomy incontinence and correlation of symptoms with urodynamic findings. *J Urol* 1998; 160: 1317-1320.
- 70.- Fowler CJ, Christmas TJ, Chapple CR, Parkhouse HF, Kirby RS, Jacobs HS. Abnormal electromyographic activity of the urethral sphincter, voiding dysfunction, and polycystic ovaries: a new syndrome?. *BMJ* 1988; 297: 1436-1438.
- 71.- Viktrup L, Bump RC. Simplified neurophysiology of the lower urinary tract. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2003; 10: 261-264.
- 72.- Sweeney DD, Chancellor MB. Treatment of stress urinary incontinence with duloxetine hydrochloride. *Rev Urol* 2005; 7: 81-86.
- 73.- Doly S, Fischer J, Brisorgueil MJ, Verge D, Conrath M. 5-HT<sub>5A</sub> receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J Comp Neurol* 2004; 476: 316-329.
- 74.- Kuipers R, Izhar Z, Gerrits PO, Miner W, Holstege G. Location of bladder and urethral sphincter motoneurons in the male guinea pig (*Cavia porcellus*). *Neurosci Lett* 2004; 362: 57-60.
- 75.- Gerrits PO, Sie JA, Holstege G. Motoneuronal location of the external urethral and anal sphincters: a single and double labeling study in the male and female golden hamster. *Neurosci Lett* 1997; 226: 191-194.

- 76.- Sasaki M. Membrane properties of external urethral and external anal sphincter motoneurons in the cat. *J Physiol* 1991; 440: 345-366.
- 77.- Holstege G, Tan J. Supraspinal control of motoneurons innervating the striated muscles of the pelvic floor including urethral and anal sphincters in the cat. *Brain* 1987; 110: 1323-1344.
- 78.- Morita T, Nishizawa O, Noto H, Tsuchida S. Pelvic nerve innervation of the external sphincter of urethra as suggested by urodynamic and horse-radish peroxidase studies. *J Urol* 1984; 131: 591-595.
- 79.- Pierce LM, Reyes M, Thor KB, Dolber PC, Bremer RE, Kuehl TJ, et al. Immunohistochemical evidence for the interaction between levator ani and pudendal motor neurons in the coordination of pelvic floor and visceral activity in the squirrel monkey. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1506-1515.
- 80.- Kuzuhara S, Kanazawa I, Nakanishi T. Topographical localization of the Onuf's nuclear neurons innervating the rectal and vesical striated sphincter muscles: a retrograde fluorescent double labeling in cat and dog, *Neurosci Lett* 1980; 16: 125-130.
- 81.- Nakagawa S. Onuf's nucleus of the sacral cord in a South American monkey (Saimiri): its location and bilateral cortical input from area 4. *Brain Res* 1980; 191: 337-344.
- 82.- Petras JM, Cummings JF. Sympathetic and parasympathetic innervation of the urinary bladder and urethra. *Brain Res* 1978; 153: 363-369.
- 83.- Roppolo JR, Nadelhaft I, de Groat WC. The organization of pudendal motoneurons and primary afferent projections in the spinal cord of the rhesus monkey revealed by horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 1985; 234: 475-488.
- 84.- Sato M, Mizuno N, Konishi A. Localization of motoneurons innervating perineal muscles: a HRP study in cat. *Brain Res* 1978; 140: 149-154.

- 85.- McKenna KE, Nadelhaft I. The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol* 1986; 248: 532-549.
- 86.- Schroder HD. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J Comp Neurol* 1980; 192: 567-587.
- 87.- Juenemann KP, Lue TF, Schmidt RA, Tanagho EA. Clinical significance of sacral and pudendal nerve anatomy. *J Urol* 1988; 139: 74-80.
- 88.- Narayan P, Konety B, Aslam K, Aboseif S, Blumenfeld W, Tanagho E. Neuroanatomy of the external urethral sphincter: implications for urinary continence preservation during radical prostate surgery. *J Urol* 1995; 153: 337-341.
- 89.- Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol* 1982; 128: 492-497.
- 90.- Zvara P, Carrier S, Kour NW, Tanagho EA. The detailed neuroanatomy of the human striated urethral sphincter. *Br J Urol* 1994; 74: 182-187.
- 91.- Strasser H, Ninkovic M, Hess M, Bartsch G, Stenzl A. Anatomic and functional studies of the male and female urethral sphincter. *World J Urol* 2000; 18: 324-329.
- 92.- Fritsch H, Lienemann A, Brenner E, Ludwikowski B. Clinical anatomy of the pelvic floor. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2004; 175: 1-64.
- 93.- Reitz A, Wefer B, Schurch B. New understanding of central and peripheral interaction between bladder and sphincter function. *EAU Update Series* 2004; 2: 153-160.
- 94.- Nitti VW. Duloxetine: a new pharmacologic therapy for stress urinary incontinence. *Rev Urol* 2004; 6 (Suppl 3): S48-S55.
- 95.- Yoshiyama M, Roppolo JR, de Groat WC. Effects of LY215490, a competitive  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

(AMPA) receptor antagonist, on the micturition reflex in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Feb;280(2):894-904.

96.- Yoshiyama M, Roppolo JR, Thor KB, de Groat WC. Effects of LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, on the micturition reflex in the urethane-anaesthetized rat. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep;110(1):77-86.

97.- Danuser H, Thor KB. Spinal 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated facilitation of pudendal nerve reflexes in the anaesthetized cat. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 150-154.

98.- Steers WD. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. En: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ. *Campbell's Urology*. Ed Saunders WB Co., Philadelphia, 1998; pp. 870–915.

99.- de Groat WC. Influence of central serotonergic mechanisms on lower urinary tract function. *Urology* 2002; 59: 30-36.

100.- Andersson KE. New pharmacologic targets for the treatment of the overactive bladder: an update. *Urology* 2004; 63 (Suppl 3A): 32-41.

101.- Corsi M, Pietra C, Toson G, Trist D, Tuccitto G, Artibani W. Pharmacological analysis of 5-hydroxytryptamine effects on electrically stimulated human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 719-725.

102.- Burgard EC, Fraser MO, Thor KB. Serotonergic modulation of bladder afferent pathways. *Urology* 2003; 62 (Suppl 4A): 10-15.

103.- Andersson KE, Appell R, Cardozo LD, Chapple C, Drutz HP, Finkbeiner AE, et al. The pharmacological treatment of urinary incontinence. *BJU Int* 1999; 84: 923-947.

104.- Vela Navarrete R, Pérez Martínez FC, Castilla Reparaz C, Cabrera Pérez J, Ramírez Pérez del Yerro M, González Enguita C. Experimental methods for "in vivo" study of detrusor-sphincteric pharmacological response: a critical review. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 461-471.

- 105.- Mattiasson A, Uvelius B. Changes in contractile properties in hypertrophic rat urinary bladder. *J Urol* 1982; 128: 1340-1342.
- 106.- Kakizaki H, de Groat WC. Role of spinal nitric oxide in the facilitation of the micturition reflex by bladder irritation. *J Urol* 1996; 155: 355-360.
- 107.- Kiruluta HG, Downie JW, Awad SA. The continence mechanisms: the effect of bladder filling on the urethra. *Invest Urol* 1981; 18: 460-465.
- 108.- Conte B, Maggi CA, Giachetti A, Parlani M, Lopez G, Manzini S. Intraurethral capsaicin produces reflex activation of the striated urethral sphincter in urethane-anesthetized male rats. *J Urol* 1993; 150: 1271-1277.
- 109.- Harada T, Constantinou CE. The effect of alpha-2 agonists and antagonists on the lower urinary tract of the rat. *J Urol* 1993; 149: 159-164.
- 110.- Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol* 1995; 153: 2004-2009.
- 111.- Jung SY, Fraser MO, Ozawa H, Yokoyama O, Yoshiyama M, De Groat WC, et al. Urethral afferent nerve activity affects the micturition reflex; implication for the relationship between stress incontinence and detrusor instability. *J Urol* 1999; 162: 204-212.
- 112.- Doi T, Kamo I, Imai S, Okanishi S, Ishimaru T, Ikeura Y, et al.: Effects of TAK-637, a tachykinin receptor antagonist, on lower urinary tract function in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 1999; 383: 297-303.
- 113.- Wilfehrt HM, Carson CC 3<sup>rd</sup>, Marson L. Bladder function in female rats: effects of aging and pregnancy. *Physiol Behav* 1999; 68: 195-203.
- 114.- Schroder A, Levin RM, Kogan BA, Das AK, Kay F, Mahashabde A. Absorption of oxybutynin from vaginal inserts: drug blood levels and the response of the rabbit bladder. *Urology* 2000; 56: 1063-1067.

- 115.- D'Hauwers K, Wyndaele JJ, Renty P, Poortmans A, Wuyts F, van Marck E. Influence of surgical bladder reduction on urodynamic parameters: three techniques investigated in a rat model. *J Urol* 2000; 163: 306-310.
- 116.- Shimizu I, Kawashima K, Ishii D, Oka M. Effects of AH-9700, (+)-pentazocine, DTG and oxybutynin on micturition in anesthetized rats with acetone-induced cystitis. *Life Sci* 2001; 69: 1691-1697.
- 117.- Lecci A, Carini F, Tramontana M, Birder LA, de Groat WC, Santicioli P, et al. Urodynamic effects induced by intravesical capsaicin in rats and hamsters. *Auton Neurosci* 2001; 91: 37-46.
- 118.- Vera PL, Nadelhaft I. Clozapine inhibits micturition parameters and the external urethral sphincter during cystometry in anesthetized rats. *Brain Res* 2001; 901: 219-229.
- 119.- Nyirady P, Thiruchelvam N, Fry CH, Godley ML, Winyard PJ, Peebles DM, et al. Effects of in utero bladder outflow obstruction on fetal sheep detrusor contractility, compliance and innervation. *J Urol* 2002; 168: 1615-1620.
- 120.- Thor KB, Katofiasc MA, Danuser H, Springer J, Schaus JM. The role of 5-HT(1A) receptors in control of lower urinary tract function in cats. *Brain Res* 2002; 946: 290-297.
- 121.- Sakamoto K, Uvelius B, Khan T, Damaser MS. Preliminary study of a genetically engineered spinal cord implant on urinary bladder after experimental spinal cord injury in rats. *J Rehabil Res Dev* 2002; 39: 347-357.
- 122.- Aikawa K, Sugino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C, Levin RM. The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *J Urol* 2003; 170: 634-637.
- 123.- Miyazato M, Sugaya K, Nishijima S, Ashitomi K, Hatano T, Ogawa Y. Inhibitory effect of intrathecal glycine on the micturition reflex in normal and spinal cord injury rats. *Exp Neurol* 2003; 183: 232-240.

- 124.- Levin RM, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Leggett RE. Effectiveness of vaginally administered oxybutynin on rabbit bladder function. *Urology* 2003; 61: 1273-1277.
- 125.- Ozturk H, Onen A, Guneli E, Cicek R, Tas Hekimoglu A. Effects of methoctramine on bladder overactivity in a rat model. *Urology* 2003; 61: 671-676.
- 126.- Durant PA, Yaksh TL. Micturition in the unanesthetized rat: effects of intrathecal capsaicin, N-vanillylnonanamide, 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. *Brain Res* 1988; 451: 301-308.
- 127.- Peterson JS, Patton AJ, Noronha-Blob L. Mini-pig urinary bladder function: comparisons of in vitro anticholinergic responses and in vivo cystometry with drugs indicated for urinary incontinence. *J Auton Pharmacol* 1990; 10: 65-73.
- 128.- Guarneri L, Ibba M, Angelico P, Testa R. Effects of oxybutynin, terodiline, and nifedipine on the cystometrogram in conscious rats with infravesical outflow obstruction. *Pharmacol Res* 1991; 24: 263-272.
- 129.- Espey M, Downie J, Fine A. Effect of 5-HT receptor and adrenoceptor antagonists on micturition in conscious cats. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 167-170.
- 130.- Berggren T, Andersson KE, Lundin S, Uvelius B. Effect and content of arginine vasopressin in normal and obstructed rat urinary bladder: an in vivo and in vitro investigation. *J Urol* 1993; 150: 1540-1543.
- 131.- Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Micturition and premicturition contractions in unanesthetized rats with bladder outlet obstruction. *J Urol* 1994; 151: 244-249.
- 132.- Yokoyama O, Ishiura Y, Nakamura Y, Ohkawa M. Urodynamic effects of intravesical oxybutynin chloride in conscious rats. *J Urol* 1996; 155: 768-771.



- 133.- Ishizuka O, Mattiasson A, Andersson KE. Role of spinal and peripheral alpha-2 adrenoceptors in micturition in normal conscious rats. *J Urol* 1996; 156: 1853-1857.
- 134.- Pandita RK, Andersson KE. Effects of intravesical administration of the K<sup>+</sup> channel opener, ZD6169, in conscious rats with and without bladder outflow obstruction. *J Urol* 1999; 162: 943-948.
- 135.- Pandita RK, Fujiwara M, Alm P, Andersson KE. Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction. *J Urol* 2000; 164: 1385-1389.
- 136.- Yoshiyama M, de Groat WC, Fraser MO. Influences of external urethral sphincter relaxation induced by alpha-bungarotoxin, a neuromuscular junction blocking agent, on voiding dysfunction in the rat with spinal cord injury. *Urology* 2000; 55: 956-960.
- 137.- Cannon TW, Damaser MS. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sci* 2001; 69: 1193-1202.
- 138.- Velasco C, Guarneri L, Leonardi A, Testa R. Influence of pump compliance (peristaltic vs. infusion) on urodynamic measurement during cystometry in conscious rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2001; 45: 215-221.
- 139.- Pandita RK, Andersson KE. Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *J Urol* 2002; 168: 1230-1234.
- 140.- Yoshiyama M, de Groat WC. Effect of bilateral hypogastric nerve transection on voiding dysfunction in rats with spinal cord injury. *Exp Neurol* 2002; 175: 191-197.
- 141.- Gu BJ, Ishizuka O, Igawa Y, Nishizawa O, Andersson KE. Role of supraspinal alpha1-adrenoceptors for voiding in conscious rats with and without bladder outlet obstruction. *J Urol* 2002; 167: 1887-1891.

- 142.- Lluet P, Barras M, Palea S. Cholinergic and purinergic contribution to the micturition reflex in conscious rats with long-term bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn* 2002; 21: 142-153.
- 143.- Seki S, Sasaki K, Fraser MO, Igawa Y, Nishizawa O, Chancellor MB, et al. Immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord reduces bladder hyperreflexia in spinal cord injured rats. *J Urol* 2002; 168: 2269-2274.
- 144.- Modiri AR, Alberts P, Gillberg PG. Effect of muscarinic antagonists on micturition pressure measured by cystometry in normal, conscious rats. *Urology* 2002; 59: 963-968.
- 145.- Velasco C, Guarneri L, Leonardi A, Testa R. Effects of intravenous and intravesical administration of suramin, terazosin and BMY 7378 on bladder instability in conscious rats with bladder outlet obstruction. *BJU Int* 2003; 92: 131-136.
- 146.- Pehrson R, Stenman E, Andersson KE. Effects of tramadol on rat detrusor overactivity induced by experimental cerebral infarction. *Eur Urol* 2003; 44: 495-499.
- 147.- Nakamura Y, Ishiura Y, Yokoyama O, Namiki M, De Groat WC. Role of protein kinase C in central muscarinic inhibitory mechanisms regulating voiding in rats. *Neuroscience* 2003; 116: 477-484.
- 148.- Lynch JJ 3rd, Brune ME, Lubbers NL, Coghlan MJ, Cox BF, Polakowski JS, et al. K-ATP opener-mediated attenuation of spontaneous bladder contractions in ligature-intact, partial bladder outlet obstructed rats. *Life Sci* 2003; 72: 1931-1941.
- 149.- Chou EC, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Levin RM. Inhibition of hyperreflexia by vaginally administered oxybutynin: a novel rabbit model. *J Urol* 2004; 171: 958-962.

- 150.- Wagg A, Cohen M. Medical therapy for the overactive bladder in the elderly. *Age Ageing* 2002; 31: 241-246.
- 151.- Nygaard IE, Kreder KJ. Pharmacologic therapy of lower urinary tract dysfunction. *Clin Obstet Gynecol* 2004; 47: 83-92.
- 152.- Fantl JA, Cardozo L, McClish DK. Estrogen therapy in the management of urinary incontinence in postmenopausal women: a meta-analysis. First report of the Hormones and Urogenital Therapy Committee. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 12-18.
- 153.- Sultana CJ, Walters MD. Estrogen and urinary incontinence in women. *Maturitas* 1994; 20: 129-138.
- 154.- Hextall A. Oestrogens and lower urinary tract function. *Maturitas* 2000; 36: 83-92.
- 155.- Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, Broderick JP, Brott T, Feldmann E, et al. Phenylpropanolamine and the risk of hemorrhagic stroke. *N Engl J Med* 2000; 343: 1826-1832.
- 156.- RANG HP, DALE MM, RITTER JM. *Farmacología*. Ed Harcourt/Churchill Livingstone. Madrid, 2000.
- 157.- Springer JP, Kropp BP, Thor KB. Facilitatory and inhibitory effects of selective norepinephrine reuptake inhibitors on hypogastric nerve-evoked urethral contractions in the cat: a prominent role of urethral beta-adrenergic receptors. *J Urol* 1994; 152: 515-519.
- 158.- Ispizuka O, Persson K, Mattiasson A, Naylor A, Wyllie M, Andersson KE. Micturition in conscious rats with and without bladder outlet obstruction: role of spinal alpha 1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 962-966.
- 159.- FLOREZ J. *Farmacología humana*. Ed Masson. Barcelona, 1997.

- 160.- Baldessarini RJ. Drugs and treatment of psychiatric disorders. En: Hardman JE, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW. The pharmacological basis of therapeutics, Ed McGraw Hill, New York, 1996; pp. 431-460.
- 161.- Khanna OP, Elkouss G, Heber D, Gonick P. Imipramine hydrochloride: pharmacodynamic effects on lower urinary tract of female dogs. *Urology* 1975; 6: 49-51.
- 162.- Oiubadewo J. The effect of imipramine on rat detrusor muscle contractility. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980; 245: 84-94.
- 163.- Levin RM, Staskin DR, Wein AJ. Analysis of the anticholinergic and musculotropic effects of desmethylinipramine on the rabbit urinary bladder. *Urol Res* 1983; 11: 259-262.
- 164.- Maggi CA, Borsini F, Lecci A, Giuliani S, Meli P, Gragnani L, et al.: The effect of acute and chronic administration of imipramine on spinal and supraspinal micturition reflexes in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248: 278-285.
- 165.- Gilja I, Radej M, Kovacic M, Parazajder J. Conservative treatment of female stress incontinence with imipramine. *J Urol* 1984; 132: 909-911.
- 166.- Lin HH, Sheu BC, Lo MC, Huang SC. Comparison of treatment outcomes for imipramine for female genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106: 1089-1092.
- 167.- Lee KS, Na YG, Dean-McKinney T, Klausner AP, Tuttle JB, Steers WD. Alterations in voiding frequency and cystometry in the clomipramine-induced model of endogenous depression and reversal with fluoxetine. *J Urol* 2003; 170: 2067-2071.
- 168.- Lose G, Jorgensen L, Thunedborg P. Doxepin in the treatment of female detrusor overactivity: a randomized double-blind crossover study. *J Urol* 1989; 142: 1024-1026.
- 169.- Kimbrough JC. Incontinence with doxepin. *JAMA* 1972; 221: 510.

- 170.- Kraijer M, Fink-Gremmels J, Nickel RF. The short-term clinical efficacy of amitriptyline in the management of idiopathic feline lower urinary tract disease: a controlled clinical study. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 191-196.
- 171.- Kruger JM, Conway TS, Kaneene JB, Perry RL, Hagenlocker E, Golombek A, et al. Randomized controlled trial of the efficacy of short-term amitriptyline administration for treatment of acute, nonobstructive, idiopathic lower urinary tract disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 749-758.
- 172.- Chew DJ, Buffington CA, Kendall MS, DiBartola SP, Woodworth BE. Amitriptyline treatment for severe recurrent idiopathic cystitis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1282-1286.
- 173.- Wong DT, Bymaster FP, Mayle DA, Reid LR, Krushinski JH, Robertson DW. LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake. *Neuropsychopharmacology* 1993; 8: 23-33.
- 174.- Fuller RW, Hemrick-Luecke SK, Snoddy HD. Effects of duloxetine, an antidepressant drug candidate, on concentrations of monoamines and their metabolites in rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 132-136.
- 175.- van Kerrebroeck P, Abrams P, Lange R, Slack M, Wyndaele JJ, Yalcin I, et al. Duloxetine versus placebo in the treatment of European and Canadian women with stress urinary incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 2004; 111: 249-257.
- 176.- Cardozo L, Drutz HP, Baygani SK, Bump RC. Pharmacological treatment of women awaiting surgery for stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 511-519.
- 177.- Ghoneim GM, Van Leeuwen JS, Elser DM, Freeman RM, Zhao YD, Yalcin I, et al. A randomized controlled trial of duloxetine alone, pelvic floor muscle training alone, combined treatment and no active treatment in women with stress urinary incontinence. *J Urol* 2005; 173: 1647-1653.

- 178.- Stahl SM, Grady MM, Moret C, Briley M. SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy and tolerability in comparison with other classes of antidepressants. *CNS Spectr* 2005; 10: 732-747.
- 179.- Lantz RJ, Gillespie TA, Rash TJ, Kuo F, Skinner M, Kuan HY, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1142-1150.
- 180.- Wong DT, Bymaster FP. Dual serotonin and noradrenaline uptake inhibitor class of antidepressants potential for greater efficacy or just hype?. *Prog Drug Res* 2002; 58: 169-222.
- 181.- Mizukawa K. The segmental detailed topographical distribution of monoaminergic terminals and their pathways in the spinal cord of the cat. *Anat Anz* 1980; 147: 125-144.
- 182.- Kojima M, Matsuura T, Kimura H, Nojyo Y, Sano Y. Fluorescence histochemical study on the noradrenergic control to the anterior column of the spinal lumbosacral segments of the rat and dog, with special reference to motoneurons innervating the perineal striated muscles (Onuf's nucleus). *Histochemistry* 1984; 81: 237-241.
- 183.- Rovner ES, Wein AJ. Once-daily, extended-release formulations of antimuscarinic agents in the treatment of overactive bladder: a review. *Eur Urol* 2002; 41: 6-14.
- 184.- Naglo AS, Nergårdh A, Boreus LO. Influence of atropine and isoprenaline on detrusor hyperactivity in children with neurogenic bladder. *Scand J Urol Nephrol* 1981; 15: 97-102.
- 185.- Naglo AS. Continence training of children with neurogenic bladder and detrusor hyperactivity: effect of atropine. *Scand J Urol Nephrol* 1982; 16: 211-215.

- 186.- Glickman S, Tsokkos N, Shah PJ. Intravesical atropine and suppression of detrusor hypercontractility in the neuropathic bladder. A preliminary study. *Paraplegia* 1995; 33: 36-39.
- 187.- Deane C, Glickman S, Gluck T, Malone-Lee JG. Intravesical atropine suppression of detrusor hyperreflexia in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 957-958.
- 188.- Fader M, Glickman S, Haggard V, Barton R, Brooks R, Malone-Lee J. Intravesical atropine compared to oral oxybutynin for neurogenic detrusor overactivity: a double-blind, randomized crossover trial. *J Urol* 2007; 177: 208-213.
- 189.- Moore KH, Hay DM, Imrie AE, Watson A, Goldstein M. Oxybutynin hydrochloride (3 mg) in the treatment of women with idiopathic detrusor instability. *Br J Urol* 1990; 66: 479-485.
- 190.- Tapp AJ, Cardozo LD, Versi E, Cooper D. The treatment of detrusor instability in post-menopausal women with oxybutynin chloride: a double blind placebo controlled study. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97: 521-526.
- 191.- Thuroff JW, Bunke B, Ebner A, Faber P, de Geeter P, Hannappel J, et al. Randomized, double-blind, multicenter trial on treatment of frequency, urgency and incontinence related to detrusor hyperactivity: oxybutynin versus propantheline versus placebo. *J Urol* 1991; 145: 813-816.
- 192.- Zorn BH, Montgomery H, Pieper K, Gray M, Steers WD. Urinary incontinence and depression. *J Urol* 1999; 162: 82-84.
- 193.- Buyse G, Waldeck K, Verpoorten C, Bjork H, Casaer P, Andersson KE. Intravesical oxybutynin for neurogenic bladder dysfunction: less systemic side effects due to reduced first pass metabolism. *J Urol* 1998; 160: 892-896.
- 194.- Waldeck K, Larsson B, Andersson KE. Comparison of oxybutynin and its active metabolite, N-desethyl-oxybutynin, in the human detrusor and parotid gland. *J Urol* 1997; 157: 1093-1097.

- 195.- Klein JT, Davis L, Olsen GE, Wong GS, Huger FP, Smith CP, et al. Synthesis and structure-activity relationships of N-propyl-N-(4-pyridinyl)-1H-indol-1-amine (besipirdine) and related analogs as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *J Med Chem* 1996; 39: 570-581.
- 196.- Huff FJ. Preliminary evaluation of besipirdine for the treatment of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 410-414.
- 197.- Huff FJ, Antuono PG, Delagandara JE, McDonald MA, Cutler NR, Cohen SR, et al. A treatment and withdrawal trial of besipirdine in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1996; 10: 93-102.
- 198.- Sramek JJ, Viereck C, Huff FJ, Wardle T, Hourani J, Stewart JA, et al. A "bridging" (safety/tolerance) study of besipirdine hydrochloride in patients with Alzheimer's disease. *Life Sci* 1995; 57: 1241-1248.
- 199.- Perrone MH, Luttinger D, Hamel LT, Fritz PM, Ferraino R, Haubrich DR. In vivo assessment of napamezole, an alpha-2 adrenoceptor antagonist and monoamine re-uptake inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 476-483.
- 200.- Garratt JC, Crespi F, Mason R, Marsden CA. Effects of idazoxan on dorsal raphe 5-hydroxytryptamine neuronal function. *Eur J Pharmacol* 1991; 193: 87-93.
- 201.- Smith CP, Huger FP, Petko W, Kongsamut S. HP 749 enhances calcium-independent release of [3H]norepinephrine from rat cortical slices and synaptosomes. *Neurochem Res* 1994; 19: 1265-1270.
- 202.- de Boer T, Nefkens F, van Helvoirt A. The alpha 2-adrenoceptor antagonist Org 3770 enhances serotonin transmission in vivo. *Eur J Pharmacol* 1994; 253: R5-R6.
- 203.- Smith CP, Woods-kettelberger AT, Corbett R, Porsolt RD, Roehr JE, Bores GM, et al: Anti-obsessional and antidepressant profile of besipirdine. *CNS Drug Rev* 1997; 3: 1-23.



- 204.- Cornfeldt M, Wirtz-Brugger F, Szewczak M, Blitzer R, Haroutunian V, Effland R, et al. HP 749: a pharmacological profile of a therapeutic agent for Alzheimer's disease (I). Abstr Soc Neurosci 1990; 16: 612.
- 205.- Huger FP, Smith CP, Petko WW, Conway PG, Effland RC, Klein JT. HP-749, a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease (II): neurochemical profile. Abstr Soc Neurosci 1990; 16: 612.
- 206.- Woods-Kettelberger AT, Smith CP, Corbett R, Szewczak MR, Roehr JE, Bores GM, et al. Besipirdine (HP 749) reduces schedule-induced polydipsia in rats. Brain Res Bull 1996; 41: 125-130.
- 207.- Hsu RS, Hubbard JW, Chesson SM, Dileo EM, Effland RC, Klein JT. Determination of HP 749, a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1991; 572: 352-359.
- 208.- Hubbard JW, Nordstrom ST, Smith CP, Brooks KM, Laws-Ricker L, Zhou L, et al.  $\alpha$ -adrenergic activity and cardiovascular effects of besipirdine HCl (HP 749) and metabolite P7480 in vitro and in the conscious rat and dog. JPET 1997; 281: 337-346.
- 209- Hubbard JW, Hsu RS, Griffiths L, Natarajan C, Dean R, Dileo EM, et al. The pharmacokinetics and cardiovascular pharmacodynamics of HP-749 (besipirdine HCl) and metabolite P86-7480 in the conscious monkey. J Clin Pharmacol 1995; 35: 688-696.
- 210.- Maggi CA, Meli A. Reserpine-induced detrusor hyperreflexia: an in vivo model for studying smooth muscle relaxants at urinary bladder level. J Pharmacol Methods 1983; 10: 79-91.
- 211.- Sohn UD, Kim CY. Suppression of the rat micturition reflex by imipramine. J Auton Pharmacol 1997; 17: 35-41.

- 212.- Wenzel BJ, Boggs JW, Gustafson KJ, Creasey GH, Grill WM. Detection of neurogenic detrusor contractions from the activity of the external anal sphincter in cat and human. *Neurourol Urodyn* 2006; 25: 140-147.
- 213.- Thor KB, Muhlhauser MA. Vesicoanal, urethroanal, and urethrovesical reflexes initiated by lower urinary tract irritation in the rat. *Am J Physiol* 1999; 277: R1002-R1012.
- 214.- Kerns JM, Shott S, Brubaker L, Sakamoto K, Benson JT, Fleischer AE, et al. Effects of IGF-I gene therapy on the injured rat pudendal nerve. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003; 14: 2-7.
- 215.- Thor KB, Muhlhauser MA, Sauerberg P, Shannon H, Springer JP. Central muscarinic inhibition of lower urinary tract nociception. *Brain Res* 2000; 870: 126-134.
- 216.- Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. Nitric Oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 2003; 61: 1079-1085.
- 217.- Chen HI. Evidence for the presynaptic action of 5-hydroxytryptamine and the involvement of purinergic innervation in the rabbit lower urinary tract. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 212-216.
- 218.- Danuseer H, Bemis K, Thor KB. Pharmacological analysis of the noradrenergic control of central sympathetic and somatic reflexes controlling the lower urinary tract in the anesthetized cat. *J Urol* 1995; 274: 820-825.
- 219.- Thor KB, Donatucci C. Central nervous system control of the lower urinary tract: new pharmacological approaches to stress urinary incontinence in women. *J Urol* 2004; 172: 27-33.
- 220.- Pérez Martínez FC, Vela Navarrete R, Castilla Reparaz C. Comparative effects of clomipramine and duloxetine on detrusor and striated sphincter function in male and female rabbits. *Arch Esp Urol* 2006; 59: 839-848.

221.- Richter KP, Ling GV. Clinical response and urethral pressure profile changes alter phenylpropanolamine in dogs with primary sphincter incompetence. J Am Vet Med Assoc 1985; 187: 605-611.

222.- Carofiglio F, Hamaide AJ, Farnir F, Balligand MH, Verstegen JP. Evaluation of the urodynamic and hemodynamic effects of orally administered phenylpropanolamine and ephedrine in female dogs. Am J Vet Res 2006; 67: 723-730.

223.- Lehtonen T, Rannikko S, Lindell O, Talja M, Wuokko E, Lindskog M. The effect of phenylpropanolamine on female stress urinary incontinence. Ann Chir Gynaecol 1986; 75: 236-241.

224.- Collste L, Lindskog M. Phenylpropanolamine in treatment of female stress urinary incontinence. Double-blind placebo controlled study in 24 patients. Urology 1987; 30: 398-403.

225.- Delorio NM. Cerebral infarcts in a pediatric patient secondary to phenylpropanolamine, a recalled medication. J Emerg Med 2004; 26: 305-307.

226.- Chung YT, Hung DZ, Hsu CP, Yang DY, Wu TC. Intracerebral hemorrhage in a young woman with arteriovenous malformation after taking diet control pills containing phenylpropanolamine: a case report. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 1998; 61: 432-435.

227.- Glick R, Hoying J, Cerullo L, Perlman S. Phenylpropanolamine: an over-the-counter drug causing central nervous system vasculitis and intracerebral hemorrhage. Case report and review. Neurosurgery 1987; 20: 969-974.

228.- Ek A, Andersson KE, Ulmsten U. The effects of norephedrine and bethanechol on the human urethral closure pressure profile. Scand J Urol Nephrol 1978; 12: 97-104.

- 229.- Ek A, Andersson KE, Gullberg B, Ulmsten U. The effects of long-term treatment with norephedrine on stress incontinence and urethral closure pressure profile. *Scand J Urol Nephrol* 1978; 12: 105-110.
- 230.- Khullar V. Drug therapy for urinary incontinence. *Business Briefing: European Pharmacotherapy* 2003. 68-72
- 231.- Kristensen E, Jakobsen J, Bartels U, Vestergaard P. Cholinergic dysfunction of heart, pupil, salivary glands and urinary bladder in healthy volunteers during long-term treatment with clomipramine. *Psychopharmacol (Berl)* 1989; 98: 398-402.
- 232.- Pfeiffer E, Guy N, Cribb A. Clomipramine-induced urinary retention in a cat. *Can Vet J* 1999; 40: 265-267.
- 233.- Hermesh H, Aizenberg D, Weizman A, Lapidot M, Munitz H. Clomipramine-induced urinary dysfunction in an obsessive-compulsive adolescent. *Drug Intell Clin Pharm* 1987; 21: 877-879.
- 234.- Rehavi M, Weiss H, Nissenkorn I, Rubinstein R, Cohen S. A comparative study of the affinities of some tricyclic antidepressants for the muscarinic cholinergic receptor in human and guinea-pig bladder, ileum and brain in relation to differential drug potency. *Life Sci* 1987; 40: 1819-1827.
- 235.- Thompson WA, Waitzel ID. Effects of imipramine in elderly incontinent psychiatric in-patients. *J Am Geriatr Soc* 1967; 15: 276-279.
- 236.- Cole AT, Fried FA. Favorable experiences with imipramine in the treatment of neurogenic bladder. *J Urol* 1972; 107: 44-45.
- 237.- Andersson KE. The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment. *Urology* 1997; 50 (Suppl 6A): 74-84.
- 238.- Wein AJ. Pharmacologic options for the overactive bladder. *Urology* 1998; 51 (Suppl 2A): 43-47.

- 239.- Andersson KE. Treatment of overactive bladder: other drug mechanisms. *Urology* 2000; 55 (Supl 5A): 51-57.
- 240.- Haeusler G, Leitich H, van Trotsenburg M, Kaider A, Tempfer CB. Drug therapy of urinary urge incontinence: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 1003-1016.
- 241.- Yoshimura N, Chancellor MB. Current and future pharmacological treatment for overactive bladder. *J Urol* 2002; 168: 1897-1913.
- 242.- Tulloch AG, Creed KE. A comparison between propantheline and imipramine on bladder and salivary gland function. *Br J Urol* 1979; 51: 359-362.
- 243.- Castleden CM, George CF, Renwick AG, Asher MJ. Imipramine: a possible alternative to current therapy for urinary incontinence in the elderly. *J Urol* 1981; 125: 318-320.
- 244.- Castleden CM, Duffin HM, Gulati RS. Double-blind study of imipramine and placebo for incontinence due to bladder instability. *Age Ageing* 1986; 15: 299-303.
- 245.- Barker G, Glenning PP. Treatment of the unstable bladder with propantheline and imipramine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1987; 27: 152-154.
- 246.- Hurley RM, Harris D, Shepherd RR. Incontinence in myelodysplasia: imipramine hydrochloride revisited. *Clin Pediatr (Phila)* 2000; 39: 489-491.
- 247.- Grossklaus DJ, Franke JJ. Treatment of elderly women with urge incontinence in middle tennessee: a single institution practice-based study. *Tenn Med* 2000; 93: 457-460.
- 248.- Hunsballe JM, Djurhuus JC. Clinical options for imipramine in the management of urinary incontinence. *Urol Res* 2001; 29: 118-125.

- 249.- Dave S, Grover VP, Agarwala S, Mitra DK, Bhatnagar V. The role of imipramine therapy in bladder exstrophy after bladder neck reconstruction. *BJU Int* 2002; 89: 557-560.
- 250.- Sureshkumar P, Bower W, Craig JC, Knight JF, Dejong TP. Treatment of daytime urinary incontinence in children: a systematic review of randomized controlled trials. *J Urol* 2003; 170: 196-200.
- 251.- Woodman PJ, Misko CA, Fischer JR. The use of short-form quality of life questionnaires to measure the impact of imipramine on women with urge incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001; 12: 312-315.
- 252.- Malone DC, Okano GJ. Treatment of urge incontinence in Veterans Affairs medical centers. *Clin Ther* 1999; 21: 867-877.
- 253.- Levin RM, Wein AJ. Comparative effects of five tricyclic compounds on the rabbit urinary bladder. *Neurourol Urodyn* 1984; 3: 127-135.
- 254.- Aaltonen L, Syvalahti E, Iisalo E, Peltomaki T. Anticholinergic activity in the serum of patients receiving maintenance amitriptyline or doxepin therapy. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985; 56: 75-80.
- 255.- Peterson GR, Blackwell B, Hostetler RM, Kuzma R, Adolphe A. Anticholinergic activity of the tricyclic antidepressants desipramine and doxepin in nondepressed volunteers. *Commun Psychopharmacol* 1978; 2: 145-150.
- 256.- Moore RH, White RP. Central anticholinergic actions of doxepin in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1975; 213: 113-120.
- 257.- Weinstein DL, Cohen JS, Liu C, Meadows ES, Plouffe L Jr, Muram D; Duloxetine in the treatment of women with stress urinary incontinence: results from DESIRE (Duloxetine Efficacy and Safety for Incontinence in Racial and Ethnic populations). *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 2121-2129.
- 258.- Brunenberg DE, Joore MA, Veraart CP, Berghmans BC, van der Vaart CH, Severens JL. Economic evaluation of duloxetine for the treatment of

women with stress urinary incontinence: a Markov model comparing pharmacotherapy with pelvic floor muscle training. Clin Ther 2006; 28: 604-618.

259.- Kinchen KS, Obenchain R, Swindle R. Impact of duloxetine on quality of life for women with symptoms of urinary incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2005; 16: 337-344.

260.- Chalon SA, Granier LA, Vandenhende FR, Bieck PR, Bymaster FP, Joliat MJ, et al.: Duloxetine increases serotonin and norepinephrine availability in healthy subjects: a double-blind, controlled study. Neuropsychopharmacology 2003; 28: 1685-1693.

261.- van Kerrebroeck P, Abrams P, Lange R, Slack M, Wyndaele JJ, Yalcin I, et al. Duloxetine versus placebo in the treatment of European and Canadian women with stress urinary incontinence. BJOG 2004; 111: 249-257.

262.- Zinner N, Dmochowski R, Miklos J, Norton P, Yalcin I, Bump R. Duloxetine vs. placebo in the treatment of stress urinary incontinence (SUI). Neurourol Urodyn 2002; 21: 383-384.

263.- Schlenker B, Gratzke C, Reich O, Schorsch I, Seitz M, Stief CG. Preliminary results on the off-label use of duloxetine for the treatment of stress incontinence after radical prostatectomy or cystectomy. Eur Urol 2006; 49: 1075-1078.

264.- Bump RC, Norton PA, Zinner NR, Yalcin I. Mixed urinary incontinence symptoms: urodynamic findings, incontinence severity, and treatment response. Obstet Gynecol 2003; 102: 76-83.

265.- Hotston MR, Hurley K, Patel S, Persad R. The use of duloxetine for stress incontinence after prostatectomy. BJU Int 2006; 98: 916-917.

266.- Ouslander JG. Management of overactive bladder. N Engl J Med 2004; 350: 786-799.

- 267.- Yarker YE, Goa KL, Fitton A. Oxybutynin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. *Drugs Aging* 1995; 6: 243-262.
- 268.- Anderson RU, Mobley D, Blank B, Saltzstein D, Susset J, Brown JS. Once daily controlled versus immediate release oxybutynin chloride for urge urinary incontinence. *J Urol* 1999; 161: 1809-1812.
- 269.- Noronha-Blob L, Lowe VC, Peterson JS, Hanson RC. Anticholinergic activity of agents indicated for urinary incontinence is an important property for effective control of bladder dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 586-593.
- 270.- Nilvebrant L, Andersson KE, Gillberg PG, Stahl M, Sparf B. Tolterodine: a new bladder selective antimuscarinic agent. *Eur J Pharmacol* 1997; 327: 195-207.
- 271.- Zaczek R, Tinker WJ, Logue AR, Cain GA, Teleha CA, Tam SW. Effects of linopirdine, HP 749 and glycyl-prolyl-glutamate on transmitter release and uptake. *Drug Dev Res* 1993, 12: 203-208.